



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL  
DE LA MOSCA NEGRA (DIPTERA: SCIARIDAE) EN  
NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch)**

**EVERT VILLANUEVA SÁNCHEZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA MOSCA NEGRA (DIPTERA: SCIARIDAE) EN NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch)** realizada por la alumna Evert Villanueva Sánchez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

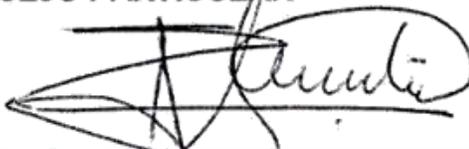
**DOCTORA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



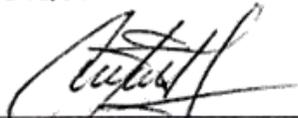
Dr. JOSÉ REFUGIO LOMELÍ FLORES

ASESOR



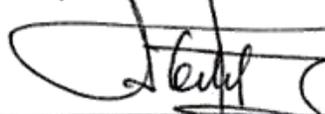
Dra. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR



Dr. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR



Dr. CARLOS ORTIZ SOLORIO

ASESOR



Dr. VÍCTOR MANUEL PINTO

# NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA MOSCA NEGRA (DIPTERA: SCIARIDAE) EN NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch)

M. C. Evert Villanueva Sánchez  
Colegio de Postgraduados, 2013

## Resumen

Las “moscas negras” (Diptera: Sciaridae), son plagas primarias en el cultivo de nochebuena en las zonas productoras del centro de México. A pesar de su importancia, no existen antecedentes sobre su identidad taxonómica, su desarrollo y sus alternativas de control diferentes a las químicas. En el presente trabajo se planteó identificar la(s) especie(s) de mosca negra asociada(s) al cultivo, caracterizar los estados biológicos de la especie más abundante, así como evaluar el potencial de control de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae* a través del estudio de su persistencia en substrato, su patogenicidad y virulencia. Para identificar las especies, se realizaron recolectas de adultos de la mosca negra en invernaderos de Atlacomulco (estado de México), Tenango de las Flores (estado de Puebla), Xochimilco (D. F.), Zacatepec y Tetela del Monte (estado de Morelos). Se obtuvieron 2,141 ejemplares. La especie más abundante (99.5%) fue *Bradysia difformis* Frey. Bajo condiciones de laboratorio (25°C y 70% HR), el ciclo de vida se completó entre 26-28 días. La diferenciación de los cuatro estadios larvales mediante morfometría de la cápsula cefálica de este díptero resultó relativamente fácil entre los estadios I y II (probabilidad de error de 1 individuo en 10,000) y el reconocimiento de los estadios II y III, y III y IV es más complicado (probabilidad de error de 17 y 36 individuos en 100, respectivamente). Por otro lado, la persistencia de *H. bacteriophora* y *S. feltiae* estuvo influenciada por el tamaño de partícula y el contenido de humedad en el substrato. Ambas especies persistieron mejor en el tamaño de partícula <1mm. *H. bacteriophora* persistió mejor a niveles de humedad entre el 40 y 60% hasta 38 días después de la aplicación (DDA) y *S. feltiae* entre el 20 y 60% hasta 23 DDA. Las pruebas de patogenicidad mostraron que *H. bacteriophora* y *S. feltiae* provocaron mortalidad tanto de larvas como de pupas de *B. difformis*, en porcentajes del 100 y 40% respectivamente. Las pruebas de virulencia en papel filtro mostraron que *H. bacteriophora* fue la especie más virulenta sobre larvas de *B. difformis* y *S. feltiae* fue la más virulenta en pupas, mientras que las pruebas realizadas en substrato indicaron que tanto *H. bacteriophora* como *S. feltiae* son altamente virulentas en larvas, mientras *H. bacteriophora* resultó más virulenta que *S. feltiae* sobre pupas.

**Palabras clave:** *Bradysia difformis*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, persistencia, patogenicidad, virulencia.

# ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES ON FUNGUS GNAT CONTROL (DIPTERA: SCIARIDAE) IN POINSETTIA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch)

M. C. Evert Villanueva Sánchez  
Colegio de Postgraduados, 2013

## Abstract

The fungus gnat (Diptera: Sciaridae), are primary pests in growing poinsettias in production areas of central Mexico. In spite of its importance, there are no precedents on their taxonomic identity, its development and alternatives to the chemical control. The objectives of this work were to identify the species of fungus gnat associated to poinsettia production areas, characterize the biological states of the most abundant species and evaluate the potential of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* for biological control, through their persistence in different substrates, and their pathogenicity and virulence. Fungus gnat collections were made in greenhouses of Atlacomulco (State of México), Tenango de las Flores (State of Puebla), Xochimilco (Distrito Federal) and Zacatepec and Tetela del Monte (State of Morelos). A total of 2,141 specimens were collected. The most abundant species was *Bradysia difformis* Frey (99.5%). Under lab conditions ( 25°C and 70% HR), the life cycle of *B. difformis* was completed in 26-28 days. The four larval instars were differentiated by morphometry (head width) of the cephalic capsule. But in spite that by this method was easy to separate the first from the second instar, it was not so useful to discriminate between the second and the third, and the third from the fourth instars as the mistake probability was 17 and 36 in 100 specimens, respectively. The persistence of *H. bacteriophora* and *S. feltiae* was influenced by the particle size and moisture content of the substrate. Both species persisted better on particle size <1mm. *H. bacteriophora* persisted better on moisture levels between 40 and 60% to 38 DDA and *S. feltiae* between 20 and 60% to 23 DDA. Pathogenicity tests showed that *H. bacteriophora* and *S. feltiae* caused mortality of both larvae and pupae of *B. difformis* as percentages of 100 and 40% respectively. Virulence tests on filter paper showed that *H. bacteriophora* was more virulent on larvae of *B. difformis* and *S. feltiae* was the most virulent in pupae, while tests on substrate indicated that both *H. bacteriophora* and *S. feltiae* are highly virulent in larvae, while the species *H. bacteriophora* was more virulent than *S. feltiae* in pupae.

**Key words:** *Bradysia difformis*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, persistence, pathogenicity, virulence

## *DEDICATORIA*

*A mi hijo*

*Zahír*

*Por ser mi mayor bendición...*

*Por ser mi motivo para luchar día con día...*

*Te amo mi principito valiente*

*A mi esposo*

*Arid Alejandro Díaz de León Rivera*

*Por ser mi compañero de vida... Por ser quien ha llenado mi vida de amor, comprensión, confianza y apoyo incondicional...*

*Gracias mi amor, Te amo*

*A mis papás*

*Clemente Villanueva Verduzco*

*Irma Sánchez Cabrera*

*Por haberme dado la vida... Por ser mi ejemplo a seguir...*

*Por darme las armas para conseguir mis objetivos...*

*Por su amor, apoyo y confianza...*

*Gracias papís... Los amo*

*A mi hermano*

*Néstor Villanueva Sánchez*

*Por todos los momentos vividos...*

*Por todo tu amor... Por tus consejos...*

*Síplemente por ser mi hermanito...*

*Gracias... Te amo "Tóto"*

*A toda mi familia de:*

*Guanajuato*

*Nayarit*

*Jalisco y*

*Puebla*

*A todos mis familiares que se adelantaron*

*Gracias por ser mis “angelitos”...*

*Gracias por guiarme en este camino...*

*Gracias por todo su amor...*

*Los extraño...*

*Los llevo en mi corazón...*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por brindarme la oportunidad de vivir y rodearme de personas que me aman.

Al **Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas**, por brindarme las condiciones y conocimientos para obtener el grado doctoral.

A los integrantes de mi **Consejo Particular Dr. José Refugio Lomelí Flores, Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Ariel W. Guzmán Franco, Dr. Carlos Ortíz Solorio y Dr. Victor Manuel Pinto**, por su invaluable asesoría, por su apoyo y cálida amistad.

Al **Dr. Sergio Ibañez Bernal y al M.C Jorge Valdéz Carrasco** por sus aportaciones en la realización de la presente investigación.

Al **Dr. Javier Hernández Morales** por su apoyo en formar parte de mi examen predoctoral oral y de mi defensa de tesis.

Al **Dr. Sergio Ramírez y al M.C Faustino García Pérez** por el apoyo en la movilización y búsqueda de moscas sciaridas en invernaderos a través del proyecto regional COFUPRO "Mercado y tecnologías para impulsar la competitividad del sistema producto ornamentales en la zona sur y centro de México".

A mis **amigos de generación** por su amistad y gratos momentos que compartimos.

A mis **amigos del Laboratorio de Patología de Insectos y del Equipo de Control Biológico**, por su afecto, orientación y apoyo.

A **Maximino Ramírez Ayala y Agustín Carrillo Solano**, por el apoyo brindado para el desarrollo del presente trabajo.

A la familia **Rivera Buendía**, en especial a la "**Godo**", por su cariño y los gratos momentos que hemos disfrutado.

*“Cuando quieres realmente una cosa,  
todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla”*

*Paulo Coelho*

*“Vive como si fueras a morir mañana,  
aprende como si fueras a vivir para siempre”*

*James Dean*

*“Sólo se ve con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos...”*

*El principito*

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
1.1 Nochebuena.....	4
1.1.1 Descripción.....	4
1.1.2 Importancia.....	5
1.1.3. Variedades .....	5
1.1.4 Plagas.....	6
1.2 Mosca negra o Fungus gnat ( <i>Bradysia</i> spp.) .....	6
1.2.1. Importancia.....	6
1.2.2 Daños y síntomas.....	7
1.2.3 Manejo.....	7
1.3 Nematodos entomopatógenos .....	10
1.3.1 Ciclo de vida.....	11
1.3.2 Asociación mutualista nematodo-bacteria.....	12
1.3.3 Factores que pueden limitar el éxito de los nematodos en el control de plagas	13
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MOSCA NEGRA (DIPTERA: SCIARIDAE) EN EL CULTIVO DE NOCHEBUENA EN EL CENTRO DE MÉXICO.....	20
2.1 INTRODUCCIÓN .....	20
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
2.2.1 Recolección del material entomológico.....	21
2.2.2 Preparación, montaje e identificación del material entomológico colectado .....	22
2.2.3 Distribución y abundancia de moscas negras en invernaderos de nochebuena en el centro de México .....	24
2.2.4 Caracterización de los estados biológicos de la mosca negra.....	24
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
2.3.1 Identificación de las especies de mosca negra .....	27
2.3.2 Caracterización de los estados de desarrollo de la mosca negra .....	28

2.3.3 Diferenciación morfométrica de los estadios larvales .....	33
2.3.4 Distribución y abundancia de mosca negra en invernaderos de nochebuena en el centro de México .....	35
CAPÍTULO III. EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y EL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUBSTRATO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS .....	
.....	39
3.1 INTRODUCCIÓN .....	39
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
3.2.1 Substrato .....	41
3.2.2 Insectos .....	42
3.2.3 Nematodos .....	42
3.2.4 Unidad experimental.....	43
3.2.5 Diseño experimental.....	43
3.2.6 Conteo de nematodos .....	44
3.2.7. Preparación de las unidades experimentales.....	44
3.2.8. Registro de galerías muertas por los nematodos entomopatógenos .....	45
3.2.9 Regulación del contenido de humedad .....	46
3.2.10 Definición de tratamientos .....	47
3.2.11 Variable evaluada.....	49
3.2.12 Análisis estadístico .....	49
3.3 RESULTADOS.....	50
3.3.1 Caracterización de los tamaños de partícula del substrato.....	50
3.3.2 Experimento de tamaño de partícula.....	51
3.3.3 Experimento de contenido de humedad.....	53
3.4 DISCUSIÓN .....	57
CAPÍTULO IV. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Sterneinema feltiae</i> SOBRE <i>B. difformis</i> .....	
.....	62
4.1 INTRODUCCIÓN .....	62
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	63
4.2.1 Nematodos .....	63
4.2.2 Insectos .....	64
4.2.3 Desinfección de material biológico .....	64

4.2.4 Unidad Experimental .....	65
4.2.5 Diseño experimental.....	65
4.2.6. Preparación de las unidades experimentales.....	65
4.2.7 Definición de tratamientos .....	67
4.2.8 Variable evaluada.....	67
4.2.9 Análisis estadístico .....	68
4.3 RESULTADOS.....	69
4.3.1 Experimento de Patogenicidad.....	69
4.3.2 Experimentos de Virulencia.....	70
4.4 DISCUSIÓN .....	72
4.4.1 Patogenicidad.....	72
4.4.2 Virulencia.....	73
CONCLUSIONES GENERALES .....	76
LITERATURA CITADA .....	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Variedades Comerciales de Nochebuena .....	5
Cuadro 2.1. Coordenadas geográficas y altitud del punto central de las zonas de colecta de los adultos de Sciaridae y radio del área recorrida en cada una de ellas .....	22
Cuadro 2.2. Medias, desviaciones estándar e intervalos calculados con el análisis discriminante para cada uno de los estadios larvales de <i>B. difformis</i> .....	35
Cuadro 2.3. Probabilidades de traslape entre los cuatro estadios larvales de <i>B. difformis</i> obtenidas del análisis discriminante.....	35
Cuadro 2.4. Abundancia de especies de MN encontradas en las zonas productoras de nochebuena en el centro del país.(INV= invernadero? H= hembras, m= machos) .....	36
Cuadro 3.1. Gramos de agua destilada que se adicionaron en cada uno de los tratamientos para obtener la humedad necesaria .....	47
Cuadro 3.2. Definición de tratamientos evaluados en el experimento del tamaño de partícula en la persistencia de nematodos.....	48
Cuadro 3.3. Definición de tratamientos evaluados en el experimento del tamaño de partícula en la persistencia de nematodos.....	49
Cuadro 3.4. Resultados de las pruebas de laboratorio realizadas a los diferentes sustratos usados .....	51
Cuadro 3.5. Comparación del número promedio en porcentaje de larvas de <i>Galleria mellonella</i> muertas por tamaño de partícula y especie de nematodo utilizando con la prueba de Kruskal-Wallis, a través del tiempo .....	55
Cuadro 3.6. Comparación del número promedio en porcentaje de larvas de <i>Galleria mellonella</i> muertas por nivel de humedad del sustrato y especie de nematodo mediante la prueba de Kruskal-Wallis, a través del tiempo .....	56
Cuadro 4.1. Virulencia (LC <sub>50</sub> s en escala logarítmica con intervalos de confianza del 95%) de los cuatro tratamientos contra <i>B. difformis</i> en papel filtro. RC= coeficiente de regresión (pendiente). .....	71
Cuadro 4.2. Virulencia (LC <sub>50</sub> s en escala logarítmica con intervalos de confianza del 95%) de los cuatro tratamientos contra <i>B. difformis</i> en sustrato. RC= coeficiente de regresión (pendiente). .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estados inmaduros de <i>B. difformis</i> . A) Huevo, B) Larva, C) Cápsula cefálica de una larva de último estadio y D) Pupa, vista dorsal, lateral y ventral. ....	31
Figura 2.2. Adultos de <i>B. difformis</i> . A) Hembra, B) Macho, C-H) Estructuras morfológicas distintivas del macho. C) Cuarto flagelómero de la antena, D) Palpo, E) Terminalia, F) Gonostilo, G) Hipopigio trapezoidal y Edeago, H) Tibia anterior con peine interno-apical. ....	32
Figura 2.3. Distribución de frecuencias de los valores observados de las cápsulas cefálicas de <i>B. difformis</i> Frey. ....	34
Figura 3.1. A) Larva de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>H. bacteriophora</i> , B) Larva de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. feltiae</i> . ....	46

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch es una planta ornamental nativa de México (Quintana, 1961) comúnmente utilizada para la decoración navideña. Pertenece a la subdivisión de las angiospermas, a la clase de las dicotiledóneas, al grupo de las apétalas, al orden geraniales, a la familia Euphorbiaceae y al género *Euphorbia* (Cabrera *et al.*, 2006). En nuestro país los principales estados productores son Morelos, Michoacán, Puebla, México, y el Distrito Federal (Galicia *et al.*, 2001). La producción nacional asciende a 16.76 millones de plantas en 247.8 hectáreas, y representa una derrama económica de más de 419 millones de pesos anuales (SIAP, 2011).

La producción de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch en México presenta varios problemas, uno de los más importantes es la incidencia de diversas plagas. Entre las plagas de mayor importancia económica están los dípteros de la familia Sciaridae, los cuales están presentes en prácticamente todas las regiones productoras. Estos dípteros se conocen comúnmente como “moscas negras” o “fungus gnats”. Las larvas de estos insectos causan daños directos a los esquejes, plantas pequeñas y maduras al alimentarse de sus raíces (Binns, 1973; Freeman, 1983; García, 2008). También causan daño indirecto ya que los adultos pueden contribuir a la propagación de patógenos al transportar esporas sobre su cuerpo (Pundt, 1999). Los síntomas que presentan las plantas atacadas se manifiestan en forma de marchitez y pérdida de hojas (Pundt, 1999; García, 2008).

Dentro del Control Biológico una alternativa para el manejo de plagas incluyendo la mosca negra es el uso de nematodos entomopatógenos, los cuales han sido utilizados exitosamente en el control de insectos pertenecientes a órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Diptera (Morris, 1985). El mayor enfoque en la investigación y desarrollo ha sido conducido principalmente en siete familias de nematodos: Allantonematidae, Heterorhabditidae, Mermithidae,

Phaenopsitylenchidae, Sphaerularidae, Steinernematidae y Tetradonematidae. Actualmente los esteinernematidos y heterorhabditidos han recibido la mayor atención como agentes de control microbiano de plagas del suelo, ya que poseen atributos de parásitos y de patógenos, presentan quimiorreceptores que les permiten buscar a su hospedero (Kaya y Gaugler, 1993). Como patógenos se caracterizan por matar rápidamente a su hospedero, gracias a la asociación mutualística con la bacteria *Xenorhabdus* en el caso de *Steinernema* y *Photorhabdus* para *Heterorhabditis* (Georgis y Kaya, 1998). Los géneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) agrupan especies que se han utilizado en diversos lugares del mundo para el control de diversas plagas (Poinar, 1972; Kaya y Gaugler, 1993). El control exitoso de moscas Sciaridas con los nematodos *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora* se ha documentado por varios autores (Gougle y Hauge, 1995; Harris *et al.*, 1995; Mansillas *et al.*, 2001; Jagdale *et al.*, 2004; Jagdale *et al.*, 2007).

Además de los daños directos e indirectos de las moscas negras en la producción, otros problemas asociados a la presencia de esta plaga en las principales zonas productoras de nochebuena en el centro de nuestro país, son: su habilidad para desarrollar resistencia a plaguicidas y la escasa información que existe en relación a la identificación taxonómica de las especies de mosca negra asociadas al cultivo, su biología y el potencial de programas de control biológico. Por esta razón, los objetivos de este trabajo fueron:

- a) Identificar la(s) especie(s) de mosca negra asociada(s) al cultivo de nochebuena en la zona productora del centro del país y caracterizar los estados biológicos de la especie más abundante.
- b) Evaluar el efecto del tamaño de partícula y contenido de humedad del substrato más utilizado en la producción de nochebuena en las zonas productoras

del centro de México, sobre la persistencia de dos especies de nematodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*, como agentes de control de la mosca negra.

c) Evaluar la patogenicidad y virulencia de *H. bacteriophora* y *S. feltiae* sobre larvas y pupas de la especie más abundante de mosca negra en laboratorio.

# CAPÍTULO I

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 Nochebuena

#### 1.1.1 Descripción

La nochebuena es una planta ornamental nativa de México. Se le conoce como Estrella de Navidad, Flor de Navidad, Hoja pintada, Planta langosta, Hoja flama mexicana, Pascua, Flor de fuego, Flor de Santa Catalina, Paño de Holanda, Bebeta, Estrella federal, Pastora, Cuetlaxochitl (Quintana, 1961). Pertenece a la subdivisión de las angiospermas, a la clase de las dicotiledóneas, al grupo de las apétalas, al orden geraniales, a la familia Euphorbiaceae y al género *Euphorbia*, que aglutina a 2000 especies (Cabrera *et al.*, 2006).

De acuerdo con Sánchez (1979), este género se caracteriza por tener flores arregladas en estructuras llamadas ciatios, estos encontrados en cimas terminales, formados por un involucro caliciforme acompañado con 4 o 5 lóbulos enteros o lacerados y grandes glándulas enteras o provistas de 2 cuernos. Numerosas flores masculinas, cada una formada de un solo estambre, con el filamento articulado y la antera globosa, de dehiscencia longitudinal. En el centro del ciatio se encuentra una flor femenina, formada por tres estilos bifidos o indivisos, con un ovulo en cada lóculo. El fruto es una capsula trilocular. Son plantas suculentas, hierbas o arbustos, con látex, con hojas alternas u opuestas. Dentro de este género se encuentra la Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Wild, ex. Klotzch) planta cultivada y que crece espontáneamente en diversos lugares.

### 1.1.2 Importancia

La nochebuena se cultiva en varias zonas de la República Mexicana, siendo los estados de Morelos, Michoacán, Puebla, México y el Distrito Federal los productores más importantes (Galicia *et al.*, 2001). Otros estados en los que también se cultiva pero en menor importancia son Veracruz, Querétaro, Guanajuato, Chiapas y Guerrero. La producción nacional asciende a 16.76 millones de plantas en 247.8 hectáreas, y representa una derrama económica de más de 419 millones de pesos anuales (SIAP, 2011).

### 1.1.3. Variedades

Actualmente existe una gran cantidad de variedades en el mercado; sin embargo siguen dominando las de color rojo (Cabrera *et al.*, 2006) (Cuadro 1.1). Las variedades más comúnmente producidas en la zona centro del país son las de color rojo.

**Cuadro 1.1.** Variedades Comerciales de Nochebuena

<b>Variedad</b>	<b>Color</b>	<b>Semana a floración</b>
Supjibi Red	Rojo	9-10 Tardía
Nutcracker Red	Rojo	9-10 Tardía
Freedom Red	Rojo	7-8 Intermedia
Festival Red	Rojo	7-8 Intermedia
Red Ángel	Rojo	7-8 Intermedia
Sonora Red	Rojo	7-8 Intermedia
Orion Red	Rojo	7-8 Intermedia
Freedom Brighth Red	Rojo	7-8 Intermedia
Red Elf	Rojo	7 Precoz
Nutcracker White	Blanco	9-10 Tardía
Freedom White	Blanco	7-8 Intermedia
Festival White	Blanco	7-8 Intermedia

Sonora White	Blanco	7-8 Intermedia
Marble Star	Mármol	8 Intermedia
Puebla	Mármol	8 Intermedia
Freedom Marble	Mármol	7-8 Intermedia
Sonora White Glitter	Jaspeado	9-10 Tardía
Monet	Jaspeado	8-10 Tardía
Davinci	Jaspeado	7-8 Intermedia
Festival Rosado	Rosado	7-8 Intermedia
Sonora Pink	Rosa	8-9 Intermedia
Maren	Salmón-Rosa	7-8 Intermedia

#### 1.1.4 Plagas

Al igual que en otros cultivos, una limitante en la producción es la presencia de plagas. Las principales plagas que afectan el cultivo de nochebuena en las zonas productoras del centro de nuestro país son: araña roja (*Tetranychus urticae* L.), mosca blanca (*Bemisia* spp., *Trialeurodes* spp.), trips (*Frankliniella* spp.) y mosca negra (*Bradysia* spp.) (Cabrera *et al.*, 2006). De estas, recientemente se ha señalado que las moscas negras representan uno de los principales problemas, ya que en caso de no realizar alguna acción contra ellas pudieran presentarse pérdidas superiores al 50% de los esquejes en las primeras etapas del cultivo (observación personal).

#### 1.2 Mosca negra o Fungus gnat (*Bradysia* spp.)

##### 1.2.1. Importancia

El nombre común de “fungus gnat” o mosca negra se aplica a varias especies de dípteros de las familias Sciaridae y Mycetophilidae. Estos insectos son plagas

comunes en viveros e invernaderos principalmente de plantas ornamentales y algunas hortalizas (García, 2008). Los inmaduros de esta plaga se desarrollan en ambientes húmedos, en materia orgánica en descomposición, en algas o donde hay hongos. A pesar que este insecto crece en áreas tales como madera húmeda y espacios pobremente ventilados, muchas infestaciones son asociadas con la humedad propia del substrato. Las larvas se alimentan de hongos, de materia orgánica en descomposición; pero si no existe alguna fuente de hongo o no está disponible, las larvas van directamente hacia los bulbos y otros órganos subterráneos frescos de las plantas (Mansillas *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Daños y síntomas**

Las larvas de estos insectos causan daños directos a los esquejes, plantas pequeñas y plantas maduras al alimentarse de sus raíces, sobre todo de las más finas y de los pelos radiculares. En caso de infestaciones muy elevadas, provocan la muerte de la planta (Binns, 1973; Freeman, 1983). Adicionalmente, los adultos pueden ayudar a la dispersión de patógenos al llevar sobre su cuerpo las esporas (Pundt, 1999) y las larvas al atacar las raíces las dejan expuestas a enfermedades por hongos patógenos (Leath y Newton, 1969) del tipo *Pythium*, *Botritis*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cykindrocladium* y *Sclerotinia* (Drees, 1994; James *et al.*, 1995; Pundt, 1999).

### **1.2.3 Manejo**

Existen diversas alternativas disponibles para el control de la mosca negra en el cultivo de nochebuena, las cuales pueden ser culturales, físicas, biológicas y/o químicas.

### **1.2.3.1 Control cultural**

De acuerdo con García (2008) existen una serie de actividades culturales que se pueden realizar para disminuir las poblaciones de mosca negra, como son: mantener limpias las instalaciones de trabajo, evitar la acumulación de basura, eliminar la maleza y la materia orgánica en proceso de descomposición, revisar los esquejes antes de su compra y al momento de recibirlos para detectar la presencia de adultos o larvas, evitar el uso de compostas que no han cubierto adecuadamente su proceso de compostaje, pasteurizar el sustrato, utilizar un sustrato con buen drenaje para evitar los excesos de humedad, manejar el riego de tal manera que el sustrato conserve y proporcione el agua que necesita la planta para su desarrollo adecuado, evitar encharcamientos de agua en las áreas de trabajo, eliminar las plantas que presenten daños por plagas de la raíz como es la mosca sciarida, efectuar una fertilización adecuada, mantener los sustratos lejos de los túneles o invernaderos, evitar la presencia de algas y utilizar puertas con mallas mosquiteras. Como se puede observar, la mayoría de ellas implica evitar la entrada y establecimiento de esta plaga. Sin embargo, cuando estas ya están presentes en el cultivo se recurre a medidas preventivas como las que se señalan a continuación.

### **1.2.3.2 Control físico**

García (2008) señala que el control físico se puede realizar mediante el trapeo de adultos y larvas a través de trampas pegajosas amarillas y rodajas de papa, respectivamente. Las trampas amarillas deben ser colocadas por encima del porte de las plantas en una relación de 10-20 trampas por mil metros cuadrados y se deben revisar de dos a tres veces por semana, cambiándolas cuando estén cubiertas de insectos. Las rodajas de papa atraen larvas de sciáridos, éstas se utilizan peladas y cortadas con un grosor aproximado de dos centímetros y tienen

que enterrarse en el sustrato a una profundidad de 2-3 cm, una o dos veces por semana se tiene que examinar el interior de cada rodaja de papa y el suelo inmediatamente debajo de ellas, y para comprobar si están siendo controladas se realiza una comparación del número de larvas antes y después de la introducción de las rodajas (García, 2008).

#### **1.2.3.3 Control químico**

El control de las moscas sciaridas es normalmente realizado con insecticidas debido a la rapidez de su efecto, facilidad de manejo, disponibilidad en el mercado y diversidad de presentaciones. Entre los productos utilizados en el control de las larvas de esta plaga en invernadero se encuentran el aldicarb (Temik), carbofurán (Furadan), clorpirifos (Lorban), diazinón (Diazinon) y el oxamyl (Vidate) (Cabrera *et al.*, 2006). A pesar de que algunos productos han mostrado eficacia, su uso frecuente tiene grandes desventajas: es una de las principales causas de la aparición de resistencia en las plagas, aparición de plagas secundarias, efectos adversos sobre organismos benéficos, riesgos a la salud del hombre, contaminación ambiental, entre otros (Lindquist *et al.*, 1985).

#### **1.2.3.4 Control biológico**

Se han reportado diversos enemigos naturales de la mosca negra como son: algunos depredadores de las familias Staphylinidae y Carabidae que atacan larvas y pupas (Hunter, 1997) y el ácaro del género *Hypoaspis* disponible comercialmente que se alimenta de larvas y pupas; pero también entomopatógenos como la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* y los nematodos entomopatógenos *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* para su aplicación en el suelo y en contra de larvas (Harris *et al.*,

1995). Siendo estos últimos a los que más potencial se les ha visto, ya que su aplicación es relativamente sencilla y existen diversos trabajos que demuestran su potencial (Gaugler, 1988; Georgis y Poinar, 1989; Akhurst y Boemare, 1990; Gaugler y Kaya, 1990; Georgis *et al.*, 1991; Kaya y Gaugler, 1993).

### **1.3 Nematodos entomopatógenos**

Actualmente el parasitismo de los nematodos para los insectos es reconocido, de los cuales más de 30 familias están asociadas en alguna vía y de éstas, nueve muestran potencial para control biológico (Kaya y Gaugler, 1993). En orden ascendente son las siguientes familias: Allantonematidae, Parasytlenchidae, Lotonchiidae, Tetradonematidae, Sphaerulariidae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estos nematodos que infectan centenares de especies de insectos, de casi todos los Órdenes ocasionan esterilidad, reducción en la fecundidad, longevidad y actividad del vuelo, retardan el desarrollo y cambios de comportamiento, morfológicos o fisiológicos (Kaya y Gaugler, 1993).

Los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae presentan atributos biológicos y ecológicos que hacen su uso seguro en el control biológico (Gaugler y Kaya, 1990; Georgis, 1992; Kaya y Gaugler, 1993; Gergis y Manweiler, 1994). Los atributos que los sitúan en posición sobresaliente son: a) búsqueda activa de hospederos (presentan quimiorreceptores y son móviles), b) exoneración de registro ante la EPA (agencia de protección del ambiente en EUA), c) virulencia extrema para insectos, d) son inocuos para vertebrados, plantas y otros organismos no objetivo, e) amplio rango de hospederos (Poinar, 1979; Woodring y Kaya, 1988; Georgis y Poinar, 1989; Akhurst y Boemare, 1990; Gaugler y Kaya, 1990; Boemare *et al.*, 1996), f) se aplican fácilmente utilizando equipos convencionales, g) son fáciles de manejar

genéticamente y h) son compatibles con muchos plaguicidas (Gaugler, 1988; Georgis y Poinar, 1989; Akhurst y Boemare, 1990; Gaugler y Kaya, 1990; Georgis *et al.*, 1991; Kaya y Gaugler, 1993).

### **1.3.1 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos es similar, aunque el esquema entre las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae varía un poco. En general comprende seis estadios, el huevo, cuatro estadios larvales y los adultos. Existen diferencias complejas debido a que en steinernematidos incluyen dos ciclos amfimícticos (sexuales) dentro del hospedero, mientras que en heterorhabditidos su ciclo es heterogónico, con hembras hermafroditas en el primero (Poinar, 1990).

Los juveniles infectivos o larvas dauer son comunes entre las especies de parásitos (de animales y plantas) y de vida libre (Bird y Bird, 1991) y son una adaptación común para el estrés ambiental entre diversas familias de nematodos rhabditidos (Evans y Womersley, 1980; Womersley, 1990), los cuales no se alimentan debido a su tracto digestivo colapsado y la boca y ano cerrados, posiblemente para limitar la pérdida de agua o el acceso de patógenos (Poinar, 1990). Los juveniles infectivos de tercer estadio de *Steinernema* y *Heterorhabditis* inician el ciclo de infección, son los responsables para localizar e invadir las larvas de una variedad de insectos hospederos favorables (Grewal y Georgis, 1999). Están adaptados para sobrevivir por largos periodos en el suelo, cubiertos por la cutícula del segundo estadio (Campbell y Gaugler, 1991). Esta “doble cutícula” protege a los nematodos de la desecación y otro tipo de estrés ambiental. Las larvas dauer durante la búsqueda de un nuevo hospedero en el suelo, no se alimentan, pero usan sus reservas de grasa. El metabolismo se reduce al mínimo, permitiendo a éstos sobrevivir por varias semanas a meses en estado

anhidrobiótico. La cutícula del segundo estadio se pierde durante la penetración en un nuevo insecto hospedero.

Después de la penetración, el nematodo libera la bacteria la cual lleva en su lumen intestinal (Bird y Akhurst, 1983; Endo y Nickle, 1991) y el insecto muere por septicemia. Dependiendo del tamaño del insecto, dos o tres generaciones pueden desarrollarse dentro del hospedero muerto. Cuando la población de nematodos ha alcanzado un umbral de una cierta densidad y las condiciones nutricionales disminuyen, un camino alternativo conduce el desarrollo para la formación de los juveniles infectivos (JI) de tercer estadio, los cuales dejan a los cadáveres de los insectos para buscar nuevos hospederos (Poinar, 1990). Los nematodos al iniciar la alimentación sobre las células y el tejido de los hospederos, se desarrollan en adultos por la vía de cuatro juveniles. Los adultos de *Steinernema* son siempre hembras y machos, la reproducción amfimíctica toma lugar, mientras que los juveniles infectivos de *Heterorhabditis* se desarrollan en hermafroditas, reproducción automíctica, aunque la fertilización misma toma lugar (Poinar, 1975).

### **1.3.2 Asociación mutualista nematodo-bacteria**

Barbercheck y Wang (1996) señalan que los esteinernematidos y heterorhabditidos son referidos como entomopatógenos, por su asociación mutualista con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. También esta estrecha relación es ilustrada por el hecho de que la mayoría de las especies de nematodos, están asociadas con una sola especie de bacteria (Akhurst y Boemare, 1988; Smiths y Ehlers, 1991).

Los juveniles son bacteriófagos, durante su desarrollo se alimentan de la bacteria que se multiplica en la hemolinfa. Cuando el J3 se transforma en juvenil infectivo, se dice que este secuestra la bacteria y la conserva en un receptáculo presente en

la unión entre esófago e intestino o bien en el lumen del intestino. La especificidad de la asociación entre nematodos y las bacterias favorece el desarrollo y multiplicación de los nematodos y la infectividad de los JI ya que suministran los nutrimentos esenciales para los nematodos (Grewal *et al.*, 1997).

El complejo nematodo-bacteria muestra gran potencial como un agente de control biológico de insectos nocivos en ambientes crípticos (Klein, 1990). Esta asociación es de fundamental importancia (Aguilera y Smart, 1993), porque *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son especies altamente patógenas de una diversidad de larvas de insectos (Dunphy y Webster, 1988).

### **1.3.3 Factores que pueden limitar el éxito de los nematodos en el control de plagas**

Los nematodos entomopatógenos han sido recuperados del suelo y de insectos infectados naturalmente. Para poder aplicarlos como agentes de control biológico, es necesario conocer las múltiples interacciones con su medio ambiente. El impacto que ejercen sobre ellos los factores bióticos y abióticos, es una limitante para su comportamiento, eficacia, dispersión y supervivencia. Los nematodos Steinernematidae y Heterorhabditidae tienen una distribución mundial y han sido aislados de una amplia variedad de ecosistemas desde los climas sub-árticos al árido y subtropical (Poinar, 1990; Hominick *et al.*, 1997). De esto se especula que las poblaciones naturales de los nematodos entomopatógenos deben de estar adaptadas a sus ambientes locales (Glazer, 1996).

El suelo es un sistema dinámico que responde a los cambios ambientales y al abastecimiento de energía (Moore *et al.*, 1988) donde las relaciones ecológicas entre los organismos están influenciadas por su estructura (Elliot y Coleman, 1988). La mayoría de los estudios sobre la eficiencia de los nematodos en

programas de control biológico han sido concernientes con la textura del suelo, el pH, la aireación, la humedad, la temperatura, la incidencia de rayos UV, a continuación se revisarán los impactos de algunos de estos factores en la efectividad de los nematodos entomopatógenos.

### **1.3.3.1 Tamaño de partícula y textura**

La actividad de los nematodos entomopatógenos puede verse afectada por muchos factores ambientales. Dos de los factores más importantes son la humedad del suelo y el tipo de suelo / textura. En el suelo, los juveniles infectivos se mueven a través de la película de agua que recubre los espacios porosos. Si esta película se vuelve demasiado delgada (en suelo seco) o los espacios de los poros están completamente llenos de agua (en suelo saturado), el movimiento de los nematodos puede ser restringido.

La supervivencia y dispersión de los nematodos tiende a ser menor en los suelos de textura fina. La infectividad de los nematodos y supervivencia, varía con las especies de nematodos y puede depender del tamaño, el comportamiento y fisiología del nematodo (Koppenhofer y Fuzy, 2006).

Las partículas de tamaño pequeño y la textura fina del suelo, puede influir en el movimiento de los nematodos e incrementar la imposibilidad de avanzar grandes distancia de traslado de un punto a otro. Generalmente los suelos arenosos tienen poros grandes, menor tortuosidad y aireación, que los suelos arcillosos (Barbercheck, 1992). También son importantes la textura y la estructura del suelo, debido a que determinan las frecuencias de los diferentes tamaños de poro. Puesto que, la mayoría de los poros en una arcilla no estructurada son de 20 $\mu$ m serán inmóviles en arcillas, porque los poros de tamaño adecuado son infrecuentes en suelos de textura fina (Wood, 1989).

Diversos estudios han demostrado baja infectividad de los nematodos *S. carpocapsae*, *S. glaseri* y *H. bacteriophora* en suelos de textura fina (Georgis y Poinar, 1983; Kung *et al.*, 1990; Molyneux y Bedding, 1984; Choo *et al.*, 1995). Esta baja infectividad puede estar correlacionada a la disminución del espacio en los poros de las partículas pequeñas del suelo que dificulta el movimiento de los nematodos (Wallace, 1958). Sin embargo, existen otros estudios en los cuales se han mostrado tendencias diferentes en el efecto de la textura del suelo sobre la infectividad de nematodos (Georgis y Gaugler, 1991; Shapiro *et al.*, 2000; Koppenhofer y Fuzy, 2006).

### **1.3.3.2 pH**

El suelo es un sistema heterogéneo y el pH de los micrositios puede variar considerablemente del promedio de la masa de suelo. La alcalinidad ocurre en suelos con saturación base o en la presencia de sales y es característico de la mayoría de las regiones áridas y semiáridas. En suelos salinos los microorganismos enfrentan problemas de altas concentraciones de iones, arriba de sus concentraciones normales intracelulares, los cuales pueden conducir al rompimiento de la función celular (Barbercheck, 1992).

En un experimento donde se evaluaron suelos franco arenosos con pH entre 4, 6, 8 y 10, la supervivencia y retención de la infectividad de las especies *S. carpocapsae* y *S. glaseri* fue mayor a un pH de 8. La supervivencia de ambas especies disminuyó considerablemente después de una semana a un pH de 10 (Kung *et al.*, 1990).

### **1.3.3.3 Aireación**

Los nematodos son organismos aerobios y la baja disponibilidad de oxígeno puede disminuir su sobrevivencia (Evans y Perry, 1979; Wharton, 1986). La aireación es dependiente de la fracción de los poros llenos de aire y los poros macroscópicos que drenan rápidamente. Por lo tanto, la falta de oxígeno limita la actividad biológica a bajos potenciales de agua. Sin embargo, muchos de los poros, con potenciales altos de agua están llenos y pueden constituir una limitante (Barbercheck, 1992). El porcentaje de oxígeno en el suelo disminuye con la profundidad, comparativamente, en suelos arcillosos o limosos la tasa de oxígeno disminuye más rápido que en los arenosos (Brady, 1974). Éste puede ser un factor limitante en los suelos con alto contenido de materia orgánica o de arcilla (Kaya, 1990). Por ejemplo, en un estudio de supervivencia e infectividad de especies de esteirne nematodos realizado por Kung *et al.* (1990) en un suelo franco arenoso a concentraciones de oxígeno entre 1 a 20%, la supervivencia disminuyó significativamente de 20 a 1%.

### **1.3.3.4 Humedad**

Los nematodos entomopatógenos (NE) requieren de una película de agua para su actividad. Consecuentemente, la distribución del tamaño de los poros y la distribución del agua en el espacio del poro, pueden afectar diferencialmente la actividad de estos organismos (Barbercheck, 1992). Kaya (1990) describió como la humedad del suelo tiene un gran impacto sobre la capacidad de búsqueda del hospedero y la actividad infectiva de los NE, así como lo hacen la temperatura y textura del suelo y destacó que la humedad, es un factor central que afecta la actividad del nematodo en el suelo y la variabilidad en el control de la eficacia es atribuida a la ineficiencia de la humedad del suelo (Lewisy Raun, 1978; Kain *et al.*, 1981; Gaugler *et al.*, 1994). En suelos mojados o saturados, el movimiento de los

nematodos entomopatógenos puede ser restringido debido a la poca tensión superficial necesaria para el movimiento (Womersley, 1990).

Los esteinernematidos y heterorhabditidos poseen un estadio infectivo móvil, que se encarga de buscar a los hospederos a través de quimiorreceptores (Schmidt y All, 1979). Los nematodos al introducirse en el suelo son capaces de permanecer infectivos por semanas (Gray y Johnson, 1983) o hasta meses (Harlan *et al.*, 1971) tiempo más que suficiente para encontrar hospederos y causar una infección. Los juveniles infectivos de diferentes especies de nematodos difieren en su comportamiento ecológico.

Por ejemplo, *S. carpocapsae* tiende a permanecer cerca de la superficie del suelo y no se desplaza lejos (Poinar, 1990) y está adaptado para infectar hospederos móviles en la superficie del suelo (de estrategia emboscadora, se sitúa y espera) (Kaya, 1990). Por otro lado, *S. glaseri* se encuentra en el suelo profundo y navega muy lejos, respondiendo fuertemente a los estímulos del hospedero y está adaptado para infectar hospederos sedentarios (estrategia asechadora activa o navegadora) (Kaya, 1990), por lo que los niveles de humedad podrían afectar su eficiencia.

Koppenhofer y Fuzy (2007) mencionaron que la infectividad óptima de los nematodos tiende a ser mejor en suelos con niveles de humedad moderados mientras que la persistencia tiende a ser mejor en suelos con niveles bajos de humedad.

### **1.3.3.5 Temperatura**

Existe una considerable variabilidad inter e intraespecífica en la tolerancia a la temperatura, en las diferentes especies de nematodos. Al respecto, Molineux

(1986) en su estudio señaló que la baja actividad entre los heterorhabditidos se encuentra a temperaturas de 10°C hasta 16 °C, y entre los esteinernematidos desde 3 °C a 14°C, pero el rango de temperatura difiere en la infectividad entre los nematodos del mismo género y de la misma especie y cepa.

Los reportes han indicado que los esteinernematidos y heterorhabditidos pueden persistir de 2-3 semanas en suelos secos (Kaya, 1990). Womersley (1990) planteó que ambos géneros son de los mejores quiescentes anhidrobiontes. Wharton (1986) destacó que las temperaturas altas (cerca de 32°C) tienen un efecto adverso sobre la reproducción, desarrollo y supervivencia de los nematodos. Molineux (1986) realizó un trabajo donde señaló que los esteinernematidos fueron más activos a bajas temperaturas que los heterorhabditidos. Sin embargo, nueve poblaciones de heterorhabditidos aislados de condiciones climáticas extremas, tales como el Desierto de Negev en Israel mostraron tolerancia incrementada al calor (Shapiro *et al.*, 1996). De igual forma, otras poblaciones semejantes de heterorhabditidos aislados en suelos áridos de Egipto (Amarashinge *et al.*, 1994) resultaron tolerantes al calor. Actualmente se están realizando estudios sobre las proteínas de estrés calórico (HSPs) conocidas por estar involucradas en la supervivencia de organismos a elevadas temperaturas (Sachlesinger, 1990). Algunos de estos genes involucrados en la producción de HSPs, fueron identificados en el nematodo de vida libre *Caenorhabdus elegans* (Jones *et al.*, 1986). La presencia de HSPs también fue detectada en *H. bacteriophora* HP88 (Selvan *et al.*, 1996).

Grewal *et al.* (1994) realizaron un estudio en el cual determinaron la amplitud de los nichos térmicos de infección, establecimiento y reproducción de doce especies y cepas de nematodos entomopatógenos colectados de diversas regiones climáticas, en el cual, se obtuvo que *S. riobravis* infectado en larvas de *G. mellonella* fue la especie con el rango de temperatura más amplio (10-39° C) mientras que *S. feltiae* fue el de menor (8-30° C). Por otro lado, la amplitud del

nicho térmico para el establecimiento en hospederos *S. glaseri* mostró el rango mas amplio (10-37°C) y *S. feltiae* (8-30° C) el más estrecho. La amplitud del nicho térmico para la reproducción mostró en primer lugar a *S. glaseri* (12-32° C) seguida de *S. carpocapsae* (20-30°C), *S. scapterisci* (20-32° C), *S. riobravis* (20-35° C) y *Steinernema* sp. (20-32° C), especies mejor adaptados a temperaturas de reproducción cálidas mientras *S. feltiae* presenta una mejor adaptación a temperaturas más bajas (10-25° C). Aunque los heterorhabditidos son endémicos de climas cálidos, los límites termales superiores y la temperatura óptima de reproducción de *H. bacteriophora* y *H. megidis* fueron mas fríos que la de algunos esteinernematidos de América del Sur y el Caribe.

#### **1.3.3.6 Luz ultravioleta**

Generalmente la porción ultravioleta de la radiación solar es considerada como el factor abiótico más destructivo, que afecta la persistencia de los nematodos y otros entomopatógenos (Ignoffo y Hostetter, 1977). La exposición de los nematodos a la luz UV también puede causar algunos efectos sobre la bacteria simbiótica asociada al nematodo (Nishimura *et al.*, 1994), la cual juega un papel importante en la muerte del hospedero y es vital para la reproducción de la progenie del nematodo (Tachibana *et al.*, 1996).

La sensibilidad de los steinernematidos a la luz ultravioleta, junto con su intolerancia a la rápida desecación (Kaya, 1990), ha resultado generalmente en desalentadora eficacia en las aplicaciones de campo contra insectos consumidores de follaje (Gaugler, 1988). Sin embargo, Bergley (1990) reportó que las aplicaciones foliares bajo sombra proporcionan un control equivalente a los insecticidas químicos.

## CAPÍTULO II

### IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MOSCA NEGRA (DIPTERA: SCIARIDAE) EN EL CULTIVO DE NOCHEBUENA EN EL CENTRO DE MÉXICO

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) es una planta ornamental nativa de México que se cultiva en varias zonas de la República Mexicana, siendo los estados de Morelos, Puebla, México y el Distrito Federal los productores más importantes (Galicia *et al.*, 2001). A nivel nacional la producción asciende a 16.76 millones de plantas en 247.75 hectáreas, lo que representa una derrama económica de 419.32 millones de pesos anuales (SIAP, 2011). Actualmente, uno de los problemas fitosanitarios que enfrentan los productores de nochebuena es la presencia de las moscas negras, conocidas también por su nombre común en inglés como “fungus gnats”. Estos son dípteros pertenecientes a las familias Mycetophilidae y Sciaridae. Estos organismos son considerados plaga principal en el cultivo de plantas ornamentales en invernadero, llegando a ocasionar pérdidas superiores al 50% en áreas de propagación de nochebuena (observación personal del autor) y como consecuencia pérdidas económicas considerables (García, 2008).

Las larvas de estos insectos causan daños directos a los esquejes, plantas pequeñas y maduras al alimentarse de sus raíces, sobre todo de las más finas y de los pelos radiculares. En caso de infestaciones muy elevadas, provocan la muerte de la planta (Binns, 1973; Freeman, 1983; García, 2008). Adicionalmente, estos insectos causan daño indirecto ya que los adultos pueden contribuir a la propagación de patógenos al transportar esporas sobre su cuerpo (Pundt, 1999). Los daños que sus larvas producen en las raíces, dejan a las plantas expuestas a

enfermedades causadas por hongos patógenos como *Pythium*, *Botritis*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cilindrocladium* y *Sclerotinia* (Leath y Newton, 1969; Drees, 1994; James *et al.*, 1995; Pundt, 1999; García, 2008). Los síntomas que presentan las plantas atacadas por las larvas de estos dípteros, se manifiestan en forma de marchitez y pérdida de hojas (Pundt, 1999; García, 2008).

Las moscas negras de la familia Sciaridae se encuentran en todos los continentes. Es un grupo rico en especies y algunas de ellas suelen ser muy abundantes. Menzel y Möhring (2000) estimaron que se han descrito más de 1,700 especies en el mundo. A pesar de su importancia económica y ecológica, estos dípteros han sido poco estudiados debido a su tamaño pequeño (<0.5 cm), a su modo de vida y a la dificultad en su identificación taxonómica.

A pesar de la importancia de las plagas de sciáridos en el cultivo de nochebuena y de otras plantas en invernaderos de México, no existen antecedentes sobre su identidad taxonómica y menos aún sobre su desarrollo, por lo que se plantearon los siguientes objetivos: a) Identificar la(s) especie(s) de mosca negra asociada(s) al cultivo de nochebuena en la zona productora del centro del país y b) caracterizar los estados biológicos de la especie más abundante.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Recolecta del material entomológico**

Se realizaron recolectas de adultos de moscas negras durante los meses de julio y agosto de 2009, en las siguientes localidades: Zacatepec, y Tetela del Monte, estado de Morelos; San Lorenzo Tlacotepec, en el Estado de México; Tenango de las Flores, en el estado de Puebla y San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, en el Distrito Federal. En cada localidad se visitaron 10 invernaderos de producción

comercial de nochebuena, a excepción del estado de Morelos en el cual se visitaron 20 invernaderos. Para cada localidad se consideró la extensión de invernaderos presentes en las áreas de recolecta, por lo que se partió de un punto central y se avanzó a lo largo de toda la circunferencia (Cuadro 2.1). En cada invernadero se realizaron muestreos por espacio de 30 minutos; los insectos se capturaron utilizando un aspirador bucal. Los adultos recolectados se sacrificaron en tubos de vidrio de 10 ml con etanol al 70%, se etiquetaron indicando la fecha y lugar de recolecta. Los ejemplares recolectados se llevaron a laboratorio para su identificación así como para estimar su abundancia y aportar datos de su distribución geográfica.

**Cuadro 2.1.** Coordenadas geográficas y altitud del punto central de las zonas de colecta de los adultos de Sciaridae y radio del área recorrida en cada una de ellas

Zona de colecta	Coordenadas geográficas	Altitud msnm	Radio m <sup>2</sup>
Zacatepec, Morelos	18°39'10.98" N, 99°11'13.87" O	925	50
Tetela del Monte, Morelos	18°58'01.38" N, 99°15'56.19" O	1869	200
San Lorenzo Tlacotepec, México	19°49'14.40" N, 99°55'33.21" O	2529	50
Tenanago de las Flores, Puebla	20°12'37.23" N, 97°59'10.89" O	1296	100
San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, D.F.	19°15'46.28" N, 99°03'25.87" O	2238	200

### **2.2.2 Preparación, montaje e identificación del material entomológico colectado**

La identificación de adultos de Sciaridae se basa principalmente en estructuras de los genitales de machos, por lo que los organismos recolectados se procesaron mediante la técnica propuesta por Ibáñez-Bernal (1999). La muestra de adultos se colocó en una caja Petri y mediante la observación al microscopio estereoscópico

de su tamaño, coloración y sus detalles morfológicos se separaron en grupos por similitud. Del material se tomó una cantidad representativa de machos y fueron transferidos a una caja Petri con solución jabonosa por dos horas. El siguiente paso fue la maceración con NaOH al 10% por 24 horas y se lavaron con agua corriente. Los insectos macerados se transfirieron a etanol al 70, 96 y 100% por 10 minutos en cada uno para lograr su deshidratación. Por último se diafanizaron en esencia de clavo y se montaron en laminillas para microscopio con Euparal®. En un cubreobjetos fijado temporalmente con una gota de agua bidestilada sobre el portaobjetos, se colocó una gota de Euparal y un ejemplar. Para cada ejemplar se separó la cabeza del tórax y se acomodó con la superficie posterior hacia el cubreobjetos con las antenas y palpos extendidos hacia abajo. El cuerpo se colocó con el lado izquierdo hacia abajo y se desprendió desde su base el ala derecha para extenderla por separado, las patas se extendieron, y los terminalia se acomodaron en vista ventro-dorsal. La muestra se dejó secar por 24 horas, al cabo de lo cual se colocó otra gota de Euparal al centro de un portaobjetos, se invirtió el cubreobjetos con el ejemplar y se colocó sobre dicha gota para completar la preparación.

La identificación a nivel de género se realizó con las claves de Steffan (1981) y Broen (2009), mediante su observación en un microscopio compuesto. Se elaboraron las ilustraciones con una cámara clara adaptada al estéreo-microscopio y se tomaron fotografías con un foto-microscopio Tessoovar de Carl Zeiss, con cámara digital para microscopía PaxCam 3. El procesamiento de las imágenes se hizo en el programa GIMP versión 2.6.11.

Se realizó una búsqueda de literatura de las diversas especies de mosca negra presentes en América, con la finalidad de poder identificar los ejemplares a nivel de especie, ya que no existen claves taxonómicas que faciliten su identificación. Así mismo, de la especie encontrada en mayor abundancia, se realizaron montajes permanentes de las cápsulas cefálicas del último estadio larval para

observar las características de las mandíbulas y maxilas, ya que de esta forma se pueden separar las especies del género *Bradysia* (Blaschke, 1988).

### **2.2.3 Distribución y abundancia de moscas negras en invernaderos de nochebuena en el centro de México**

Para aportar datos sobre la distribución geográfica y determinar la abundancia de las moscas negras asociadas a nochebuena en el centro de México, en primera instancia se requirió la identificación de ejemplares; para lo cual se realizaron preparaciones temporales en glicerina de todos los adultos colectados en las diferentes localidades. Los ejemplares de cada localidad se contabilizaron para obtener el número total de adultos colectados, posteriormente se separaron por sexo para determinar la cantidad de hembras y machos presentes en cada una y finalmente, se identificaron los machos, para obtener el número de individuos por especie.

### **2.2.4 Caracterización de los estados biológicos de la mosca negra**

#### **2.2.4.1 Cría de la especie más abundante**

La especie más abundante fue criada en laboratorio empleando como fundadores adultos colectados en 10 invernaderos de nochebuena de Zacatepec, Morelos siguiendo el método propuesto por Harris (1995) con algunas modificaciones. El método consiste en colocar 100 ejemplares adultos en un recipiente de plástico transparente de un litro de capacidad preparado con una capa de peat-moss humedecida con 8 cm de espesor. Los recipientes se mantuvieron húmedos agregando agua corriente cada 10 días; tras la eclosión, las larvas se alimentaron con rodajas de papa de 3 cm de largo por 1cm de ancho, de la variedad Alfa. Las

rodajas de papa se enterraban en el sustrato y eran sustituidas cada semana, al ser devoradas rápidamente por las larvas. Los adultos emergidos (cada mes aproximadamente) se capturaron con un aspirador bucal y fueron colocados en otros recipientes, para continuar con el incremento de la colonia. Los insectos se mantuvieron en una cámara de cría a 25°C, 75% de humedad y con un fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas de obscuridad (Kennedy, 1973).

#### **2.2.4.2 Determinación y caracterización taxonómica**

Se realizó con 100 ejemplares de cada estado biológico, a través de observaciones directas en el microscopio estereoscópico y de fotografías tomadas con microscopio de luz y electrónico. Los ejemplares estudiados procedieron de la colonia controlada. Para la toma de fotografías se probaron diversos medios como el bálsamo de Canadá, la glicerina, el alcohol al 70% y el gel transparente de cabello, resultando más apropiados el etanol al 70 % para los huevecillos y adultos y el gel para cabello comercial para el caso de las larvas y pupas. Para los huevos y pupas se consideró la forma, tamaño y color, para las larvas se tomó en consideración la forma del cuerpo, el color, aspectos morfológicos de la cápsula cefálica, del fronto-clípeo, de las mandíbulas y de las maxilas. En lo que respecta a los adultos, su caracterización se basó en el tamaño, color, patrón de venación de las alas, forma y tamaño de los palpos, de las tibias anteriores y de los flagelómeros antenales; para los machos, adicionalmente se observó el hipopigio y los gonostilos.

Los cuatro estadios larvales (Mansilla *et al.*, 2001), son difíciles de diferenciar debido a su parecido y a que no es observable la exuvia. Existen antecedentes relacionados con la utilización de las medidas de las anchuras de las cápsulas cefálicas para separar estadios larvales de varias especies de insectos holometábolos (Drooz, 1965; Fox *et al.*, 1972); se empleó el método desarrollado

por Dyar (1890) que consiste en diferenciar morfométricamente los diferentes estadios de desarrollo larval (empleado por él para lepidópteros). González *et al.* (1984) aplicaron este método para determinar los estadios larvales de *Zabrotes subfasciatus* Boh, Veeranna y Remadevi (2010) para comprobar el número de estadios larvales de *Alcterogystia cadambae* Moore, Mohammed (2011) para determinar los estadios larvales del lepidóptero *Agrotis ipsilon* Hufnagel. El método de Dyar también ha sido utilizado para determinar los parámetros morfométricos de estadios larvales de algunas especies de dípteros, como es el caso del trabajo Coscarón e Ibáñez-Bernal (2002) para determinar el número de estadios larvales de *Simulium haematopotum* Malloch (Diptera: Simuliidae) y el realizado por Frouz *et al.* (2002) con dos especies de Chironomidae, *Chironomus crassicaudatus* Malloch y *Glyptotendipes paripes* Edwards.

El estudio de las cápsulas cefálicas se realizó con larvas de diferentes estadios de desarrollo, obtenidas de la cría de la especie de mosca negra más abundante. Las larvas de primer estadio provenían de la recolecta de 100 huevecillos que fueron colocados en una caja Petri con un papel filtro humedecido, los cuales se observaron diariamente y se obtuvieron 45 larvas. Los estadios consecutivos se obtuvieron de 80 larvas colectadas al azar de la cría, las cuales fueron separadas en dos grupos de 40 larvas cada uno, con relación al tamaño de sus cápsulas cefálicas se consideró que uno de ellos tendría larvas del segundo y tercer estadios y que el otro agruparía larvas del tercero y cuarto estadios.

Las larvas fueron sacrificadas en etanol al 70% y colocadas directamente en portaobjetos que contenían un poco de gel transparente para cabello comercial, éste método fue el más efectivo ya que es un medio que facilita la manipulación de las cápsulas cefálicas para orientarlas de manera adecuada.

El método utilizado para medir el ancho de las cápsulas cefálicas fue el método de medición por análisis computarizado de imágenes (Rodríguez *et al.*, 2000) Las

imágenes fueron obtenidas mediante un foto-microscopio Tessoar de Carl Zeiss, con cámara digital para microscopía PaxCam 3. Las observaciones se hicieron con los objetivos de 6.3X y 16X. De la misma manera se capturó la imagen de la reglilla micrométrica.

El análisis de las imágenes se hizo mediante el programa Image Tool Versión 2.01 Alpha 4, con el cual se obtuvieron las dimensiones de anchura, uniéndose con la línea de la herramienta de medición del programa los puntos más externos de los bordes laterales de la cápsula (genas) (Figura 2.1C). Con los datos obtenidos se elaboraron las distribuciones de frecuencias para dichas medidas en clases de 10  $\mu\text{m}$ , mediante Microsoft Excel 2007, posteriormente se realizó un análisis discriminante utilizando el programa SAS 9.2, ya que se presentó traslape entre los estadios II-III y III-IV, a través del cual se establecieron los límites en la anchura de las cápsulas cefálicas de cada estadio y la probabilidad de traslape entre éstos.

## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1 Identificación de las especies de mosca negra**

Las claves taxonómicas de género propuestas por Steffan (1981) y Broen (2009), así como las características de las mandíbulas y maxilas del último estadio larval (Blaschke, 1988) y las características morfológicas de los adultos (Menzel *et al.*, 2003), permitieron determinar que la especie más abundante fue *Bradysia difformis* Frey 1948 (Figuras 2.1 y 2.2).

### 2.3.2 Caracterización de los estados de desarrollo de la mosca negra

El huevo es ovalado y liso, mide en promedio 260  $\mu\text{m}$  de largo y 134  $\mu\text{m}$  de ancho. Recién ovipositados son de color blanco lechoso y conforme van madurando se tornan de color transparente, siendo posible ver la larva en formación (Figura 2.1A).

La larva es de tipo vermiforme, de color blanco transparente, con la cápsula cefálica negra y muy esclerotizada. Presenta cuatro estadios larvales (Figura 2.1B). La cápsula cefálica presenta el puente tentorial completo, cuerpo con los pliegues locomotores carentes de espículas. Tienen las mandíbulas aproximadamente 1.6 veces más largas que anchas. El diente principal no siempre está agrupado paralelamente al segundo, puede encontrarse desplazado en el momento en que su parte superior se coloca entre los dientes segundo y tercero. Las dos sensilas localizadas en el borde exterior están muy juntas. La prosteca casi siempre tiene diez láminas principales. Con frecuencia, la lacinia tiene ocho dientes (menor y mayor). La protuberancia de la galea se superpone a la mitad de los dientes de la lacinia. La seda II es relativamente larga (Blaschke, 1988).

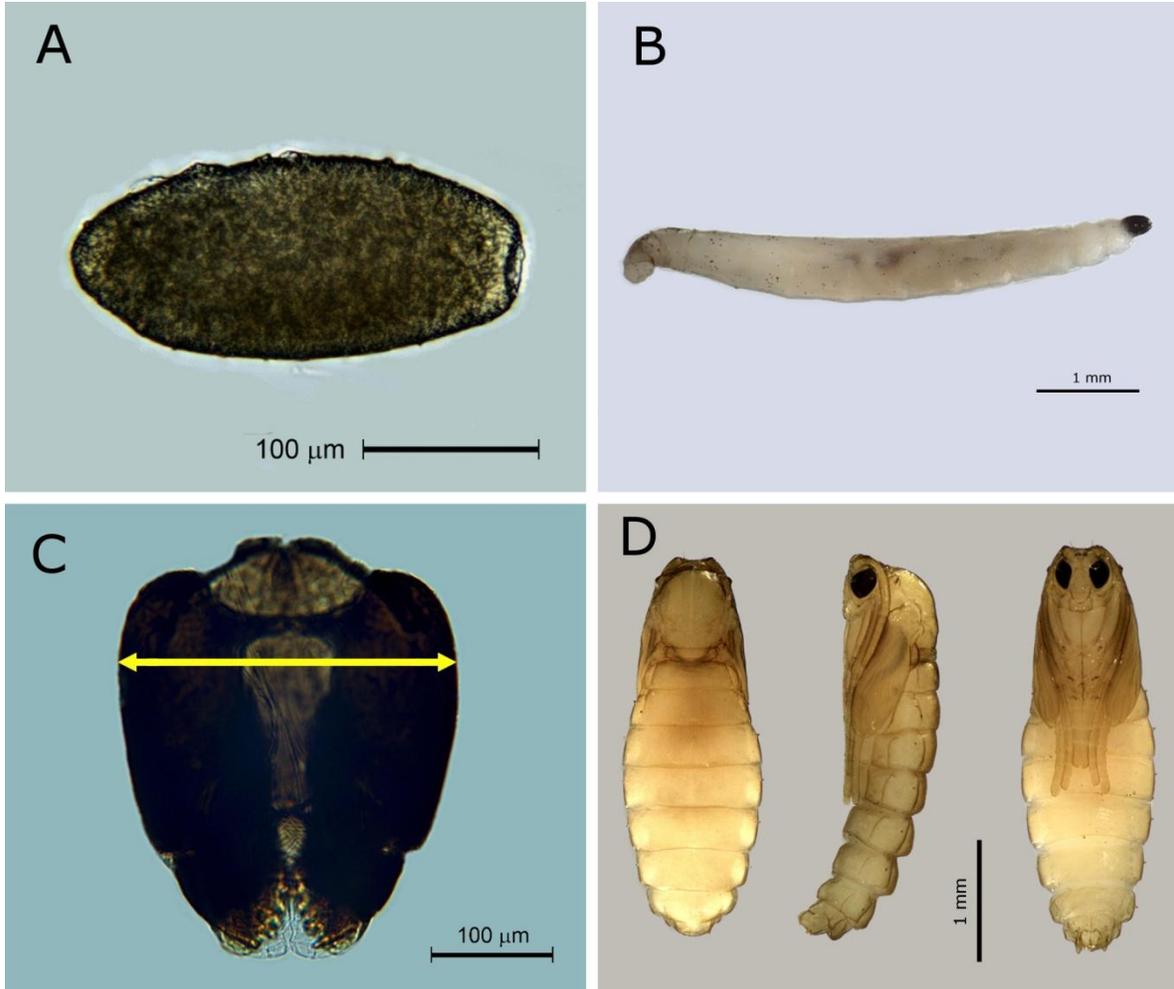
La pupa es del tipo obtecta, ya que sus apéndices están visibles pero se encuentran pegados al cuerpo. Tienen un tamaño similar al del adulto. Recién formada es de color blanco lechoso, conforme van pasando los días se va tornando de color amarillo hasta obtener una coloración café rojiza y asemejarse al adulto (Figura 2.1D).

Los adultos son de color negro cubiertos con sedas abundantes. Presentan dimorfismo sexual, la hembra es más grande que el macho (Figuras 2.2A y 2.2B). Cabeza con la probóscide menor de 0.5 la longitud de la cabeza. Gena terminando a un nivel dorsal con respecto al margen ventral del ojo. Clípeo pequeño. Palpo

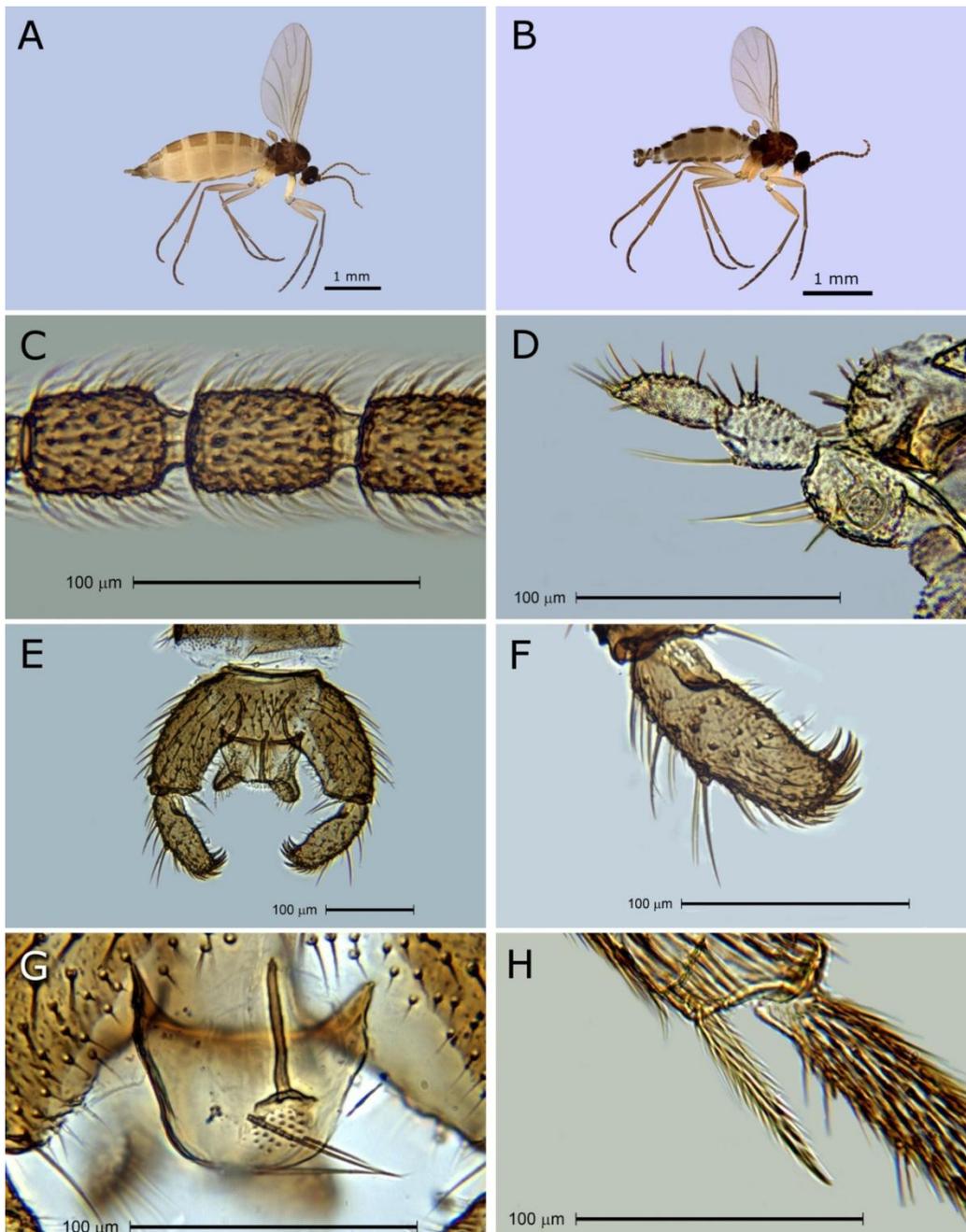
con tres segmentos. Sus antenas son aproximadamente tan largas como 0.25 la longitud de su cuerpo y tienen un escapo, un pedicelo y el flagelo compuesto de 14 flagelómeros. Su tórax es de color negro, del cual se originan tres pares de patas largas comparadas a Psychodidae y cortas comparadas con Tipulidae, con las coxas y fémures de color amarillo, mientras que las tibias y los tarsos son negros. Tibia anterior con sedas modificadas en la porción anteroapical dispuestas en una sola hilera. Tibia media y posterior con dos espolones de tamaño diferente. Uñas tarsales simples. Sus alas son membranosas de color cenizo, con venas gruesas y fuertes, con la vena M en forma de Y ( $M_1$  y  $M_2$ ) simétrica, ya que la vena  $M_1$  está sólo ligeramente arqueada cerca de la base. Venas M y CuA desnudas. Vena  $R_1$  corta alcanzando la C antes o al nivel de la base de la ramificación de M. El abdomen en su parte lateral presenta una coloración clara a diferencia del resto que es de color oscuro, en el último segmento, el macho presenta los terminalia en forma de pinza (Figura 2.2E) y en la hembra el abdomen termina en forma adelgazada.

El macho presenta la cabeza con un puente ocular continuo, formado por 2-4 hileras de facetas, predominando las hileras de dos facetas. Antenas pardas oscuras uniformes. El cuarto flagelómero es 1.75 veces más largo que ancho, con superficie ligeramente rugosa, sedas tan largas como 0.5 la anchura del flagelómero (Figura 2.2C). La porción inferior de la frente con sedas oscuras, clípeo con sedas oscuras. Palpo claro con tres segmentos, el segmento basal con cinco sedas, una de las cuales es más larga y una sensila profunda circular; fórmula del palpo; 1.0:0.9:1.4 (Figura 2.2D). Tórax y abdomen pardo oscuro. Patas claras con las tibias y tarsos oscurecidos por el recubrimiento de sedas. Postpronoto desnudo, mesonoto con sedas pequeñas y largas. Catepisternón corto y triangular, escudete con tres sedas fuertes entre otras más pequeñas. Tibia anterior con peine interno-apical de 6-7 espinas y un solo espolón (Figura 2.2H). Tibia media y posterior con dos espolones de tamaño similar. Uñas tarsales sencillas. Su cuerpo mide 2.5 mm. Ala ceniza vena M y Cu fuertes sin

macrotriquia; membrana del ala sin macrotriquia; tronco de M ( $6.0\mu$ ) y ramas de M ( $5.4\mu$ )  $x=1.0y$ , desnudos. Tallo CuA  $0.66$  la longitud de  $x$ ;  $R_1$   $0.75$  la longitud de R alcanzando la C antes de la base de la ramificación de M; Costa alcanzando  $0.5$  de la distancia entre la vena  $R_5$  y  $M_1$ ; Balancines pardo claro. Hipopigio trapezoidal, tan largo como  $0.55$  su anchura en la parte media; sin lóbulo basal; cara interna de los gonocoxitos corta con sedas oscuras que son más gruesas y largas cerca de la base (Figura 2.2G). Tergo IX corto, tan ancho como  $1.6$  su longitud en la parte media con sedas largas en sus márgenes laterales. Gonostilo  $2.4$  veces más largo que su anchura máxima, el ápice sencillo con sedas gruesas y fuertes, con una seda muy gruesa en el ápice y  $7$  sedas algo más delgadas en el margen interno antes del ápice; el campo de dientes preapical algo proyectado, pero más ancho que alto (Figura 2.2F). Edeago con base esclerotizada (Figura 2.2G). La hembra presenta antenas con flagelómeros cortos; el cuarto flagelómero no es más pequeño que el del macho, pero en la mayoría es  $1.6-2.0$  veces más largo que ancho. Los palpos son de tres segmentos; el segmento basal a menudo con una sensila profunda. Las alas son largas y estrechas. El tronco de la vena M más largo que la bifurcación de M.  $C = 0.66$  de  $w$ . Todas las demás características como en el macho. Mide  $3.4$  mm.



**Figura 2.1.** Estados inmaduros de *B. difformis*. A) Huevo, B) Larva, C) Cápsula cefálica de una larva de último estadio y D) Pupa, vista dorsal, lateral y ventral.



**Figura 2.2.** Adultos de *B. difformis*. A) Hembra, B) Macho, C-H) Estructuras morfológicas distintas del macho. C) Cuarto flagelómero de la antena, D) Palpo, E) Terminalia, F) Gonostilo, G) Hipopigio trapezoidal y Edeago, H) Tibia anterior con peine interno-apical.

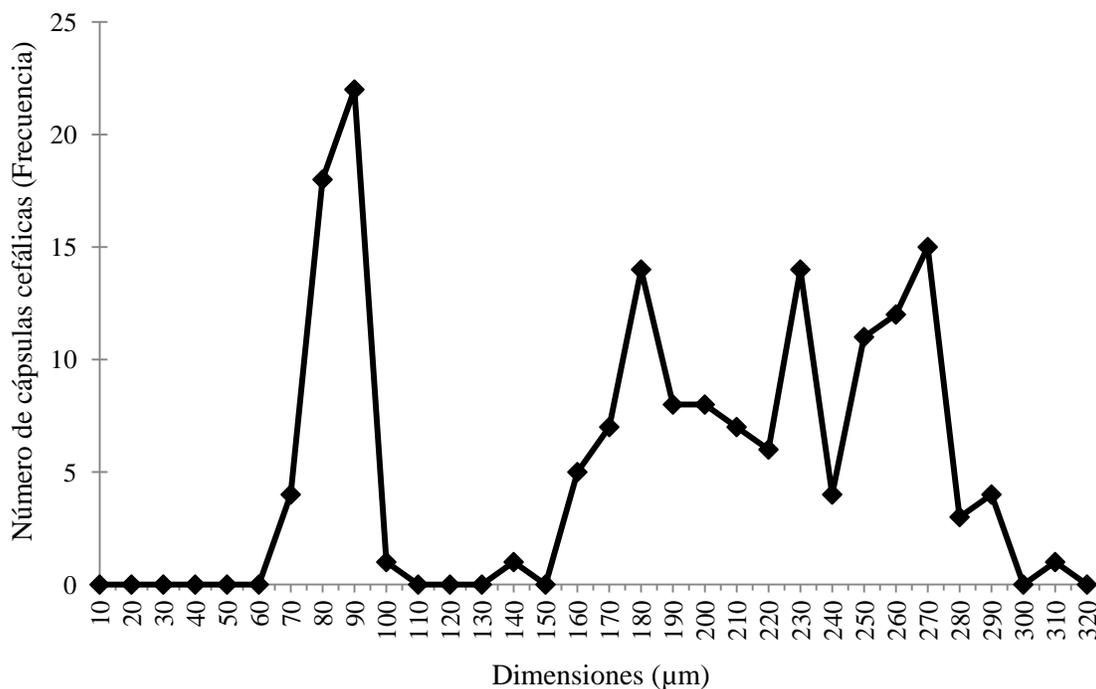
### 2.3.3 Diferenciación morfométrica de los estadios larvales

Como ya se mencionó *Bradysia difformis* pasa por cuatro estadios larvales (Mansilla *et al.*, 2001). Las medidas de anchura de las cápsulas cefálicas se distribuyeron en cuatro subpoblaciones, las cuales corresponden a cada uno de los estadios larvales (Figura 2.3). Los valores que representan al estadio I están bien diferenciados, pero no es el caso para los estadios II, III y IV, lo que significa que existe traslape entre las medidas de éstos. Debido a lo anterior es que se tuvo que realizar un análisis discriminante, utilizando el programa SAS 9.2, partiendo del supuesto de que cada curva presentaba una distribución normal, se calculó su media y su desviación estándar. Las medias obtenidas para los estadios I, II, III y IV fueron de 79, 192, 237 y 252, respectivamente; por otro lado sus desviaciones estándar fueron de 6.5, 24, 25 y 19, respectivamente (Cuadro 2.2).

Los resultados obtenidos del análisis discriminante realizado con el programa SAS 9.2, mostraron que los límites en la anchura de la cápsula cefálica de las larvas del estadio I van de 62 a 102.98  $\mu\text{m}$  y la probabilidad de que un individuo de este estadio se confunda o agrupe con uno del segundo es aproximadamente de 1 individuo en 10,000. Para el estadio II los límites son de 102.99 a 214.42  $\mu\text{m}$  y la probabilidad de que un individuo del segundo estadio se confunda con uno del tercero es de 17 individuos en 100. Con relación a los estadios III y IV los límites van de 214.43 a 245.36  $\mu\text{m}$  y de 245.37  $\mu\text{m}$  en adelante, respectivamente, y la probabilidad de confusión entre un individuo del tercer estadio con uno del cuarto es de 36 individuos en 100 (Cuadros 2.2 y 2.3).

Con base en los resultados obtenidos es conveniente buscar otras características que permitan identificar los estadios con relación a estructuras diferentes a la medida de anchura de sus cápsulas cefálicas para tener mayor exactitud en la diferenciación de éstos, como en el trabajo realizado por Rodríguez *et al.* (2000) quienes utilizaron un “Factor de Proporción” resultante de la multiplicación de la

longitud por la anchura de las cápsulas cefálicas de larvas de *Zabrotes subfasciatus* Boh para ubicar los especímenes inmaduros en el estadio que les corresponde con mayor precisión. Así como el estudio realizado por Frouz *et al.* (2002) quienes concluyeron que cuatro parámetros morfométricos cefálicos: largo, ancho, ancho del mentón y longitud cefalolabial, fueron los mejores indicadores en la diferenciación de instares larvales de los dípteros *Chironomus crassicaudatus* Malloch y *Glyptotendipes paripes* Edwards, demostrando que entre más parámetros se tomen en cuenta habrá mejor exactitud en la separación de estadios. Por otro lado, Coscarón e Ibáñez-Bernal (2002) en su estudio lograron determinar el número de estadios larvales de *Simulium haematopotum* Malloch a través de mediciones de la longitud de la postgena de 1203 especímenes, sugiriendo que existen algunas especies de Diptera cuyos estadios larvales son fácilmente separados con un solo parámetro morfométrico.



**Figura 2.3.** Distribución de frecuencias de los valores observados de las cápsulas cefálicas de *B. difformis* Frey.

**Cuadro 2.2.** Medias, desviaciones estándar e intervalos calculados con el análisis discriminante para cada uno de los estadios larvales de *B. difformis*

Estadio	Media	Desv. Estándar	Intervalos ( $\mu\text{m}$ )
I	79	6.5	62.00-102.98
II	192	24	102.99-214.42
III	237	25	214.43-245.36
IV	252	19	245.37-en adelante

**Cuadro 2.3.** Probabilidades de traslape entre los cuatro estadios larvales de *B. difformis* obtenidas del análisis discriminante

Estadios	Probabilidad de traslape
I y II	0
II y III	0.1796
III y IV	0.3658

### 2.3.4 Distribución y abundancia de mosca negra en invernaderos de nochebuena en el centro de México

En total se colectaron 2,141 ejemplares en los cinco sitios de colecta. El 99.5% correspondió a la especie *B. difformis*. Sólo se colectaron 9 ejemplares que correspondieron a tres especies no identificadas de *Bradysia* y un ejemplar de un género diferente (Cuadro 2.4). De los ejemplares colectados de *B. difformis* el 75% fueron machos, por lo que se establece que la relación sexual en campo es de tres machos por cada hembra. En la localidad de Tenango de las Flores Puebla se colectó el mayor número de ejemplares con 711, de los cuales, 582 (81.5%) fueron machos y 129 (18.14%) hembras, seguida por Zacatepec, Morelos, en donde se obtuvieron 424 ejemplares de los cuales 294 (69.3%) fueron machos y 130 hembras (30.66%); y Tetela del Monte, Morelos con 389 ejemplares (286

machos y 103 hembras, representando el 73.52% y 26.47%, respectivamente); sin embargo, en esta última localidad, tres ejemplares fueron una especie diferente a *B. difformis*. Por otro lado, en San Lorenzo Tlacotepec Atlacomulco, Estado de México, de los 377 ejemplares colectados, 7 no pertenecieron a la especie *B. difformis*, del resto 273 (72.41%) fueron machos y 104 hembras (27.58%). En San Gregorio Atlapulco Xochimilco, D.F., se colectó el menor número de individuos de *B. difformis* con 240, 177 machos (73.75%) y 63 hembras (26.25%).

De acuerdo con los registros más actuales de distribución geográfica, *Bradysia difformis* se ha registrado en Azerbaiyán, República Checa, Finlandia, Alemania, Reino Unido, Italia, Japón, Letonia, Rusia, España, Suiza y Holanda y en las Américas en los Estados Unidos y Brasil (Menzel *et al.*, 2003), por lo que el presente constituye el primer registro de la especie en México.

**Cuadro 2.4.** Abundancia de especies de MN encontradas en las zonas productoras de nochebuena en el centro del país. (INV= invernadero? H= hembras, m= machos)

LOCALIDAD	INV.	# H	# M	TOTAL	ESPECIE
	1	10	41	51	<i>B. difformis</i>
	2	15	29	44	<i>B. difformis</i>
	3	18	20	38	<i>B. difformis</i>
	4	20	33	53	<i>B. difformis</i>
Zacatepec	5	18	31	49	<i>B. difformis</i>
Morelos	6	11	24	35	<i>B. difformis</i>
	7	15	27	42	<i>B. difformis</i>
	8	8	29	37	<i>B. difformis</i>
	9	6	29	35	<i>B. difformis</i>
	10	9	31	40	<i>B. difformis</i>
SUBTOTAL	10	130	294	424	----
	1	14	38	52	<i>B. difformis</i>
					<i>B. sp1</i> (1 ejemplar)
	2	9	31	40	<i>B. difformis</i>

	3	11	43	54	<i>B.difformis</i>
					<i>B. sp1 (2 ejemplares)</i>
	4	13	35	48	<i>B.difformis</i>
	5	8	25	33	<i>B.difformis</i>
Tetela del Monte	6	5	31	36	<i>B.difformis</i>
Morelos	7	9	13	22	<i>B.difformis</i>
	8	17	21	38	<i>B.difformis</i>
	9	10	19	29	<i>B.difformis</i>
	10	7	30	37	<i>B.difformis</i>
SUBTOTAL	10	103	286	389	----
	1	16	19	35	<i>B.difformis</i>
	2	8	37	45	<i>B. difformis</i>
	3	10	41	51	<i>B. sp2 (5 ejemplares)</i>
					<i>B.difformis</i>
	4	18	35	53	<i>B.sp3 (1 ejemplar)</i>
San Lorenzo					Género dif. (1
Tlacotepec,					ejemplar)
Atacomulco	5	7	23	30	<i>B.difformis</i>
Edo. de México	6	12	24	36	<i>B.difformis</i>
	7	5	29	34	<i>B.difformis</i>
	8	13	17	30	<i>B.difformis</i>
	9	6	27	33	<i>B.difformis</i>
	10	9	21	30	<i>B.difformis</i>
SUBTOTAL	10	104	273	377	----
	1	9	68	77	<i>B.difformis</i>
	2	20	46	66	<i>B.difformis</i>
	3	13	51	64	<i>B.difformis</i>
	4	15	38	53	<i>B.difformis</i>
Tenango de las	5	13	84	97	<i>B.difformis</i>
Flores	6	10	75	85	<i>B.difformis</i>
Puebla	7	18	61	79	<i>B.difformis</i>
	8	8	59	67	<i>B.difformis</i>
	9	11	37	48	<i>B.difformis</i>
	10	12	63	75	<i>B.difformis</i>
SUBTOTAL	10	129	582	711	----

	1	9	21	30	<i>B.difformis</i>
	2	3	19	22	<i>B.difformis</i>
	3	7	26	33	<i>B.difformis</i>
	4	10	13	23	<i>B.difformis</i>
San Gregorio	5	8	20	28	<i>B.difformis</i>
Atlapulco	6	9	17	26	<i>B.difformis</i>
Xochimilco, D.F.	7	6	17	23	<i>B.difformis</i>
	8	5	14	19	<i>B.difformis</i>
	9	2	15	17	<i>B.difformis</i>
	10	4	15	19	<i>B.difformis</i>
SUBTOTAL	10	63	177	240	----
TOTAL	50	529	1,612	2,141	----

## CAPÍTULO III

### EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y EL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUBSTRATO EN LA PERSISTENCIA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, son parásitos letales de insectos que habitan en el suelo (Hominick, 2002) y se utilizan en el control biológico de plagas insectiles en diversas ornamentales y en diversos sistemas de producción agrícola tanto en campo abierto como en invernadero (Grewal *et al.*, 2005). Estos pudieran ser utilizados en la producción de nochebuena, para el control de una de las principales plagas del suelo en este cultivo, la mosca negra *Bradysia difformis* Frey (Diptera: Sciaridae) (Villanueva, segundo capítulo de esta tesis), y de acuerdo a observaciones realizadas en diversos invernaderos, se tiene la hipótesis de que la severidad de los daños de mosca negra pudiera verse afectada, entre otros aspectos, por el tipo de substrato utilizado y su contenido de humedad. El control de esta plaga frecuentemente se hace con insecticidas químicos, pero una alternativa la constituyen los nematodos *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora* que son infectivos en el tercer estadio juvenil (J3), el cual encuentra a su hospedero guiado por quimioestimulantes como CO<sub>2</sub> y productos de excreción (Gaugler *et al.*, 1980).

El éxito de los nematodos entomopatógenos para el control de insectos en el suelo y su supervivencia, depende de la capacidad que tienen los J3 de dispersarse y persistir en el ambiente, hasta que localizan a un hospedero. Se ha demostrado que numerosos factores intrínsecos (comportamiento y fisiología), extrínsecos (temperatura, humedad, textura del suelo y radiación UV) y bióticos (competencia

y enemigos naturales) afectan su dispersión y persistencia (Kaya, 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Smits, 1996). Varios autores han señalado que en el suelo el factor más importante para la persistencia de los nematodos entomopatógenos es la humedad disponible (Molyneux y Bedding, 1984; Kung *et al.*, 1991; Koppenhöfer *et al.*, 1995; Grant y Villani, 2003 a, b) ya que estos necesitan de humedad para moverse eficientemente entre las partículas del sustrato. Koppenhöfer *et al.* (1995) señalan que si la película de la solución se vuelve demasiado delgada (suelos secos), o bien, si los espacios están llenos de agua (suelos saturados) la movilidad de los nematodos se puede restringir e incluso pueden morir.

Por otro lado, estudios realizados para evaluar la eficiencia de nematodos en el control de plagas del suelo han mostrado resultados variables en la eficiencia y esta variabilidad se atribuye a menudo a insuficiente humedad del suelo (Lewis y Raun, 1978; Kain *et al.*, 1981; Kaya, 1990; Gaugler *et al.*, 1994). Por lo que algunos autores recomiendan irrigar el suelo antes y/o después de la aplicación de nematodos (Georgis, 1990; Downing, 1994; Selvan *et al.*, 1994; Shetlar *et al.*, 1998).

La retención de humedad del suelo se relaciona con su textura, otro factor importante, ya que el tamaño de partícula influye fuertemente en la disponibilidad y retención de agua. Kung *et al.* (1991) han señalado que, suelos con poros pequeños en combinación con alta humedad, limitan los niveles de oxígeno, la actividad y la sobrevivencia de los nematodos. Consecuentemente, la eficiencia de los nematodos en el control de insectos plaga que habitan en el suelo puede disminuir en texturas arcillosas.

Considerando lo anterior y que existen pocos estudios donde se determine la eficiencia de nematodos entomopatógenos en el control de *B. difformis* en condiciones de producción comercial de nochebuena, se desarrolló el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto del tamaño de partícula y contenido de

humedad del sustrato más utilizado en la producción de nochebuena en las principales zonas productoras del centro de México, sobre la persistencia de dos especies de nematodos entomopatógenos, *S. feltiae* y *H. bacteriophora*, como agentes de control de la mosca negra.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Los experimentos para estudiar: el tamaño de partícula y el contenido de humedad en el sustrato, sobre la persistencia de los nematodos entomopatógenos *S. feltiae* y *H. bacteriophora* fueron llevados a cabo en el laboratorio de Control Biológico del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco Estado de México.

### **3.2.1 Substrato**

En ambos experimentos se utilizó como sustrato la mezcla más usada por los productores de nochebuena del estado de Morelos, México, la cual está formada con 40% de tezontle, 36% de fibra de coco, 18% de hoja de encino y 6% de cascarilla de arroz. La mezcla fue proporcionada por el INIFAP de Zacatepec Morelos, México.

El sustrato se dividió en tres partes en el experimento donde se evaluó el tamaño de partícula: una de ellas, se dejó intacta (a Granel) y las otras dos fueron tamizadas, para tener otros dos tamaños de partícula (Tamiz 1 <3mm y Tamiz 2 <1mm); mientras que en el experimento de contenidos de humedad sólo se utilizó el sustrato a granel.

Los substratos se esterilizaron durante un periodo de dos horas con vapor de agua caliente en un esterilizador de metal con capacidad de 1000 litros conectado en su parte inferior a una parrilla con gas LP. Los substratos se extendieron bajo sombra durante una semana para desecarlos y luego caracterizarlos en el Laboratorio de Génesis, Morfología y Clasificación de Suelos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México.

### **3.2.2 Insectos**

Larvas maduras de último estadio de *Galleria mellonella* L. se utilizaron como indicadores de la persistencia en el substrato, de los nematodos evaluados, ya que en general han demostrado ser altamente susceptibles a la infección por los nematodos entomopatógenos (Koppenhöfer y Fuzy, 2007). Las larvas de *Galleria* fueron proporcionadas por el laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

### **3.2.3 Nematodos**

Los nematodos de la especie *Steinernema feltiae* (ENTONEM ®) fueron proporcionados por la empresa Koppert México, mientras que *Heterorhabditis bacteriophora* se obtuvieron del cepario de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, los cuales se multiplican sobre larvas de *G. mellonella*.

### **3.2.4 Unidad experimental**

En ambos experimentos, la unidad experimental fue una maceta de plástico de 6 pulgadas de diámetro, con 500 g de substrato estéril. En cada maceta fueron enterradas cuatro jaulas de malla mosquitera metálica (1 cm de diámetro por 4 cm de altura cubiertas con un tapón de plástico de 8 mm de largo y 1 cm de diámetro) con una larva madura de último estadio de *G. mellonella*, y 5000 juveniles infectivos (JI) de nematodos entomopatógenos. En los dos experimentos, las macetas testigo también contenían las cuatro jaulas con larvas, pero no se les adicionaron los nematodos entomopatógenos.

En el experimento de tres tamaños de partícula, todas las macetas con substrato estéril fueron regadas con agua destilada estéril hasta alcanzar un 40% de humedad aprovechable; mientras que en el experimento de contenido de humedad, las macetas se mantuvieron con 20, 40, 60, 80 y 100% de humedad aprovechable, según el correspondiente tratamiento.

### **3.2.5 Diseño experimental**

Los dos experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar, para el experimento de tamaño de partícula se establecieron 10 repeticiones y en el de contenido de humedad cinco. Todos los experimentos se desarrollaron en una cámara de cría ubicada en el Campus Montecillo del Colegio de Posgraduados en Montecillo Edo. de México, a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 12:12 (luz: oscuridad), humedad relativa del 60%.

### **3.2.6 Conteo de nematodos**

Previo al establecimiento de los experimentos fue necesario realizar una suspensión de nematodos para aplicar la densidad de nematodos establecida por unidad experimental. En el caso de *S. feltiae*, los nematodos se recibieron en material inerte sólido, se pesaron 0.5 g del substrato en el que se adquirieron y luego se suspendieron en 100 ml de agua destilada estéril utilizando un vortex. Ya que *H. bacteriophora* se recibió en suspensión líquida, no fue necesario realizar la suspensión.

De la suspensión de cada especie de nematodo se obtuvieron 10 muestras de 50 microlitros, en donde se determinó el número promedio de nematodos vivos. Por último se calculó la cantidad de microlitros de suspensión necesaria para aplicar los 5000 JI requeridos en cada unidad experimental (maceta) de los bioensayos (experimentos).

### **3.2.7. Preparación de las unidades experimentales**

En cinco ml de agua destilada se suspendieron 5000 juveniles infectivos de los nematodos (JI) y se aplicaron en la superficie de la parte central de cada maceta. Las jaulas de malla mosquitera con larvas maduras de *G. mellonella* se introdujeron 24 horas después de la inoculación con nematodos para asegurar que éstos se dispersaran por toda la superficie y se adaptaran a las condiciones del medio.

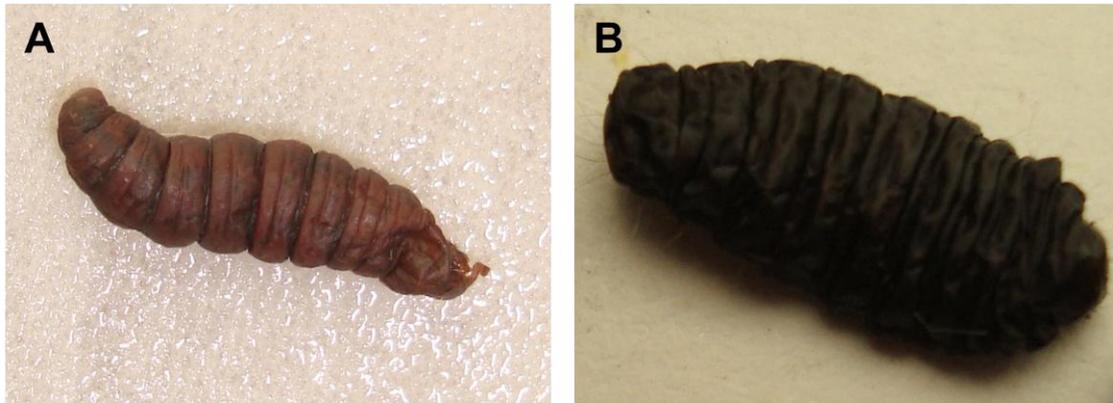
Las jaulas con larvas de *G. mellonella*, usadas como insecto cebo, se colocaron a una profundidad de 5 cm y se dejaron dentro de las macetas por tres días, tiempo suficiente para lograr la infección pero evitando que se completara una generación de los nematodos y con ello el incremento de inóculo. Transcurrido este tiempo se

sacaron las jaulas con *G. mellonella* y se registró el número de larvas muertas por maceta.

### **3.2.8. Registro de larvas muertas por los nematodos entomopatógenos**

Las larvas muertas se enjuagaron con agua destilada para retirar el substrato pegado a su cuerpo y se colocaron en cajas Petri (50 mm) con papel filtro humedecido con agua destilada estéril y se dejaron por 10 días para corroborar que su muerte fue por efecto de los nematodos y no por otros factores, por lo que se realizaron observaciones diarias (durante el periodo) bajo el microscopio estereoscópico: tanto de la coloración característica de los cadáveres (en rojo, las muertas por *H. bacteriophora* y café oscuro o negro por *S. feltiae*) (Figura 3.1), como de la emergencia de nematodos de los cadáveres.

Durante el cuarto día, las macetas permanecieron sin larvas. A partir del día cinco, nuevamente se repitió el proceso de exponer larvas de *G. mellonella* frente a los nematodos (inicialmente inoculados en las macetas). Todo el proceso se repitió, hasta que después de dos lecturas consecutivas ya no se presentó mortalidad del insecto cebo lo cual ocurrió a 43 días después de la inoculación. En total se obtuvieron nueve observaciones (lecturas), ya que después de este tiempo los nematodos dejaron de actuar por agotamiento de inóculo.



**Figura 3.1.** A) Larva de *G. mellonella* infectada por *H. bacteriophora*, B) Larva de *G. mellonella* infectada por *S. feltiae*.

### 3.2.9 Regulación del contenido de humedad

En el experimento de tamaño de partícula, diariamente se revisaba el contenido de humedad en las macetas, con un medidor de humedad de suelo “Soil Moisture Meter” y cada que era necesario se adicionaba agua destilada estéril hasta restablecer y mantener constante el 40% de humedad en el substrato.

En el experimento de contenido de humedad, la cantidad de agua destilada que se agregó a cada una de las macetas para obtener la correspondiente humedad deseada en el substrato, se calculó con la fórmula utilizada para determinar el porcentaje de humedad en el suelo, según el método gravimétrico de Ortiz (1990) (Cuadro 3.1).

$$\begin{aligned} \% \text{ Humedad} &= \frac{\text{Peso suelo húmedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo seco}} \times 100 \\ &= \frac{\text{Peso del agua}}{\text{Peso suelo seco}} \times 100 \end{aligned}$$

**Cuadro 3.1.** Gramos de agua destilada que se adicionaron en cada uno de los tratamientos para obtener la humedad necesaria

Tratamiento	Peso del agua (w/w)
20 %	100 g
40 %	200 g
60 %	300 g
80 %	400 g
100 %	500 g

El porcentaje de humedad a los 5 cm de profundidad (lugar donde se encontraban las jaulas con las larvas de *Galleria*), se corroboró diariamente de dos maneras, la primera con la ayuda de un medidor de humedad “Soil Moisture Meter”, el cual registra la humedad de manera directa; y la segunda, con base en las diferencias diarias de peso que presentaron cada una de las macetas ya preparadas (con el sustrato, la humedad, los nematodos y las jaulas con larvas de *G. mellonella*), adicionándoles agua destilada de reposición diariamente, cuando lo requerían.

### **3.2.10 Definición de tratamientos**

#### **3.2.10.1 Experimento de tamaño de partícula.**

Los tratamientos consistieron en tres tamaños de partículas del sustrato: a Granel, Tamiz 1 (<3mm) y Tamiz 2 (<1mm), dos especie de nematodos entomopatógenos (*Steinernema feltiae* ENTONEM ® y *Heterorhabditis bacteriophora*) y tres testigos generales (Granel, Tamiz 1 (<3mm) y Tamiz 2 (<1mm)), con 10 repeticiones. En total se evaluaron nueve tratamientos (Cuadro 3.2). La estructura de este experimento corresponde a un arreglo factorial de tratamientos 3x2, con dos factores: tamaños de partícula (con tres niveles) y

especies de nematodo (con dos niveles), al que se adicionaron tres testigos generales.

**Cuadro 3.2.** Definición de tratamientos evaluados en el experimento del tamaño de partícula en la persistencia de nematodos

<b>Tratamiento</b>	<b>Definición</b>
1	Substrato a granel y <i>H. bacteriophora</i>
2	Substrato Tamiz 1 y <i>H. bacteriophora</i>
3	Substrato Tamiz 2 y <i>H. bacteriophora</i>
4	Substrato a granel y <i>S. feltiae</i>
5	Substrato Tamiz 1 y <i>S. feltiae</i>
6	Substrato Tamiz 2 y <i>S. feltiae</i>
7	Testigo a granel sin nematodos
8	Testigo Tamiz 1 sin nematodos
9	Testigo Tamiz 2 sin nematodos

### 3.2.10.2 Experimento de contenido de humedad

Se evaluaron cinco tratamientos los cuales consistieron en cinco porcentajes de humedad en el substrato: 20%, 40%, 60%, 80% y 100% por cada especie de nematodo (*S. feltiae* ENTONEM® y *H. bacteriophora*) con 5 repeticiones cada uno. Los testigos generales incluidos fueron 20%, 40%, 60%, 80% y 100% mismos que no contenían nematodos. En total se evaluaron 15 tratamientos (Cuadro 3.3). La estructura del experimento corresponde a un arreglo de tratamientos factorial 5x2, con dos factores: contenidos de humedad (con cinco niveles) y especies de nematodo (con dos niveles), al que se adicionaron cinco testigos generales.

### 3.2.11 Variable evaluada

En los dos experimentos cada cinco días se evaluó la mortalidad de larvas de *G. mellonella* en cada tratamiento, a los 3, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38 y 43 días después de la aplicación (DDA) de los nematodos.

### 3.2.12 Análisis estadístico

Ambos experimentos se repitieron dos veces en el tiempo, considerando que no hubo diferencias significativas entre fechas, los datos obtenidos se combinaron para su análisis. Los resultados se analizaron mediante una prueba de medias ajustadas y un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis bajo un diseño experimental completamente al azar utilizando el programa SAS 9.2 (2008). Los testigos no fueron considerados en el análisis ya que no se presentó mortalidad de larvas.

**Cuadro 3.3.** Definición de tratamientos evaluados en el experimento del tamaño de partícula en la persistencia de nematodos

Tratamiento	Definición
1	<i>H. bacteriophora</i> y 20%
2	<i>H. bacteriophora</i> y 40%
3	<i>H. bacteriophora</i> y 60%
4	<i>H. bacteriophora</i> y 80%
5	<i>H. bacteriophora</i> y 100%
6	<i>S. feltiae</i> y 20%
7	<i>S. feltiae</i> y 40%
8	<i>S. feltiae</i> y 60%
9	<i>S. feltiae</i> y 80%
10	<i>S. feltiae</i> y 100%
11	Testigo 20% sin nematodos

12	Testigo 40% sin nematodos
13	Testigo 60% sin nematodos
14	Testigo 80% sin nematodos
15	Testigo 100% sin nematodos

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Caracterización de los tamaños de partícula del sustrato

El sustrato a granel fue el que presentó mayor contenido de materia orgánica mientras que el Tamiz 1 (<3mm) y Tamiz 2 (<1mm) presentaron porcentajes similares entre sí (Cuadro 3.4). El pH más alto lo presentó el Tamiz 2 y el más bajo el a granel. La conductividad eléctrica más alta la obtuvo el Tamiz 2. La capacidad de intercambio catiónico del tamaño de partícula a granel y el Tamiz 2 fueron similares entre sí, mientras que la del Tamiz 1 estuvo por debajo de estos dos. La cantidad de los elementos solubles Na, K y Ca fue más elevada que la de los elementos intercambiables Na, K y Ca en los tres tamaños de partícula. Por otro lado, el contenido del Mg intercambiable fue mayor que del Mg soluble en los tres tamaños de partícula. El sustrato a granel fue el que presentó mayor cantidad de Fósforo en comparación con el Tamiz 1 y el Tamiz 2. De igual forma, la cantidad de nitrógeno en el sustrato a granel fue mayor que la del Tamiz 1 y Tamiz 2, siendo la misma en estos dos últimos.

**Cuadro 3.4.** Resultados de las pruebas de laboratorio realizadas a los diferentes sustratos usados

ANÁLISIS	A GRANEL	TAMIZ 1 (<3mm)	TAMIZ 2 (<1mm)
% M.O	23.74	10.51	10.12
pH	6.7	7.5	7.7
C.E.	3.09	2.79	3.28
CIC	13.48 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	12.84 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	13.27 CmolC+1kg <sup>-1</sup>
Ca I	5.43 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	5.89 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	5.69 CmolC+1kg <sup>-1</sup>
Mg I	13.68 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	13.22 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	11.56 CmolC+1kg <sup>-1</sup>
Na I	1.36 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	0.91 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	1.04 CmolC+1kg <sup>-1</sup>
K I	0.41 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	0.34 CmolC+1kg <sup>-1</sup>	0.45 CmolC+1kg <sup>-1</sup>
Na S	9.71 mmol/L	8.64 mmol/L	9.60 mmol/L
K S	32.4 mmol/L	35.45 mmol/L	41.80 mmol/L
Ca S	2.88 mmol/L	3.58 mmol/L	4.59 mmol/L
Mg S	5.04 mmol/L	4.11 mmol/L	4.86 mmol/L
Fósforo	100 ppm	30.3 ppm	32.6 ppm
Nitrógeno	0.015%	0.005%	0.005%

I: intercambiable, S: soluble

### 3.3.2 Experimento de tamaño de partícula

Los nematodos de la especie *H. bacteriophora* presentaron mayor persistencia que los nematodos de la especie *S. feltiae* independientemente del tamaño de partícula del sustrato a través del tiempo (Cuadro 3.5). Considerando el tamaño de partícula, ambas especies de nematodos persistieron mejor en el Tamiz 2 (<1mm).

La mortalidad causada por los nematodos de la especie *H. bacteriophora* a los 3 y 8 días después de su aplicación (DDA), tanto en el Tamiz 2 y a Granel, superó estadísticamente en el número de larvas muertas al Tamiz 1 (Cuadro 3.5).

En el Tamiz 2 *H. bacteriophora* ocasionó una mortalidad estadísticamente superior al Tamiz 1 y al Granel desde los 13 a los 28 DDA. En el sustrato a Granel y

Tamiz 1 el porcentaje de mortalidad de larvas a los 13 DDA fue de 26.3 y 25.0%, respectivamente, mientras que en el Tamiz 2 de 57.5%. A los 18 DDA los porcentajes fueron de 45.0, 13.8 y 61.3% en Granel, Tamiz 1 y Tamiz 2, respectivamente. El substrato a granel presentó un porcentaje de mortalidad de 11.3% a los 23 DDA mientras que los substratos Tamiz 1 y Tamiz 2 presentaron mortalidades de 7.5 y 37.5% en este mismo día. A los 28 DDA los porcentajes fueron de 8.8% en a granel, 6.3% en Tamiz 1 y 26.3% en Tamiz 2 (Cuadro 3.5). Los resultados anteriores sugieren que los nematodos de la especie *H. bacteriophora* persisten mejor en partículas finas (<1mm). Sin embargo, 33 DDA el mayor porcentaje de mortalidad se presentó en el substrato a granel con 21.3%. Finalmente a los 38 DDA el tamiz 1 obtuvo el mayor porcentaje de larvas muertas con 20.0%. Esta especie de nematodo, 43 DDA, dejó de causar mortalidad de larvas en los tres tamaños de partícula sugiriendo que ya no persistieron en los substratos (Cuadro 3.5).

Por otro lado, los niveles de mortalidad por los nematodos de la especie *S. feltiae* a los 3 DDA en los tres tamaños de partícula no presentaron diferencias significativas; los porcentajes de mortalidad fueron, a granel 52.5%, Tamiz 1 37.5% y Tamiz 47.5% (Cuadro 3.5). A los 8 DDA ya se presentaron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad entre los tres tamaños de partícula, siendo el Tamiz 2 el que presentó mayor mortalidad con 45.0%. El tamaño de partícula más pequeño (Tamiz 2 <1mm) mostró una mortalidad estadísticamente superior al resto (Tamiz 1 y granel) desde los 13 hasta los 33 DDA con porcentajes de mortalidad de 26.3% a los 13 DDA, 55.0% a los 18 DDA, 15.0% a los 23 DDA, 47.5% a los 28 DDA y 38.8% a los 33 DDA; lo que sugiere que esta especie persiste mejor en partículas fina. 38 DDA el porcentaje de mortalidad más alto lo mantuvo el Tamiz 2 con 8.8%, seguido del Granel con 5.0% y el más bajo fue de 1.3% en el Tamiz 1. Al igual que *H. bacteriophora* esta especie (*S. feltiae*) dejó de causar mortalidad de larvas a los 43 DDA (Cuadro 3.5).

### 3.3.3 Experimento de contenido de humedad

En general la especie *H. bacteriophora* presentó mayor persistencia que *S. feltiae* a través del tiempo, independientemente del contenido de humedad presente en el sustrato. Considerando el contenido de humedad, ambas especies de nematodos persistieron mejor a un nivel de humedad del 40% (Cuadro 3.6).

Estadísticamente, *H. bacteriophora* ocasionó la mayor mortalidad a un nivel de humedad del 40% sobre los niveles 20, 80 y 100%, desde los 23 DDA hasta los 33 DDA. Y también mayor sobre el 60% desde los 33 a los 38 DDA (Cuadro 3.6).

La mortalidad ocasionada por *H. bacteriophora* no fue estadísticamente diferente entre los niveles de humedad evaluados a los 3 DDA. El porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria* a los 3 DDA en los niveles de humedad 20, 40, 60 y 80% fue del 100% mientras que en el nivel de humedad de 100% fue de 97.5%. A los 8 DDA la mortalidad fue del 90% para los niveles de humedad del 40, 80 y 100%, y se redujo a 80% en los tratamientos con 60 y a 75% para el nivel 20% de humedad (Cuadro 3.6).

El porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria* ocasionado por *H. bacteriophora* a los 13 DDA fue mayor en el nivel de humedad del 40% con un 72.5% mientras que en el resto de niveles de humedad la mortalidad osciló cerca del 50%. A los 18 DDA los porcentajes de mortalidad disminuyeron en todos los niveles de humedad en comparación con los obtenidos a los 13 DDA, a pesar de esto, el nivel del 40% siguió presentando el mayor porcentaje de mortalidad.

A los 23 DDA se mostraron diferencias estadísticas entre los diferentes niveles de humedad evaluados con la especie *H. bacteriophora*, a pesar de esto, el nivel de humedad de 40% conservó el mayor porcentaje de mortalidad (47.5%). A los 28 DDA se presentó el mismo comportamiento que a los 23 DDA, sin embargo, el porcentaje de mortalidad disminuyó (35.0%); por otro lado, en el nivel de humedad

del 100% ya no se presentó mortalidad de larvas. A los 33 DDA, los niveles de humedad del 20, 80 y 100% ya no presentaron mortalidad de larvas mientras que los niveles del 40 y 60% presentaron mortalidades del 12.5 y 5.0%, respectivamente. *H. bacteriophora* siguió causando mortalidad de larvas a los 38 DDA en los niveles de humedad del 40 y 60% y a los 43 DDA terminó su efecto (Cuadro 3.6).

Por otra parte, la mortalidad ocasionada por *S. feltiae* a los 3 DDA fue estadísticamente superior en los niveles de humedad del 20, 40, 60 y 80% (mayores a 95%) sobre el nivel del 100% donde se obtuvo un nivel de mortalidad del 87.5% (Cuadro 3.6). A los 8 DDA también se presentaron diferencias significativas entre los niveles de humedad; estadísticamente, los niveles del 40, 60 y 80% fueron los que presentaron mayor porcentaje de mortalidad de larvas con 90.0%, para los tres casos.

De los 13 DDA hasta los 18 DDA el mayor porcentaje de mortalidad de larvas por *S. feltiae* se observó en los niveles de humedad del 40 y 60% con porcentajes de mortalidad de 60 y 40%, respectivamente. Sin embargo, de los 23 hasta los 38 DDA estadísticamente el mayor porcentaje de mortalidad solo lo presentó el nivel de humedad del 40%. Esta especie en el nivel de humedad del 100% dejó de causar mortalidad a partir de los 28 DDA. En los niveles de 20 y 80% la mortalidad dejó de presentarse a partir de 33 DDA, mientras que en los niveles de 40 y 60% a los 43 DDA (Cuadro 3.6).

**Cuadro 3.5.** Comparación del número promedio en porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* muertas por tamaño de partícula y especie de nematodo utilizando con la prueba de Kruskal-Wallis, a través del tiempo

Especie	Tamaño de Partícula	DIAS DESPUES DE LA APLICACIÓN								
		3	8	13	18	23	28	33	38	43
Hb	Granel	100±0.0a	71.3±7.3ab	26.3±6.4b	45.0±8.0bc	11.3±6.1c	8.8±5.2c	21.3±5.8ab	8.8±3.8abc	0.0±0.0
Hb	Tamiz 1	72.5±5.1b	68.8±7.2b	25.0±6.3b	13.8±4.2d	7.5±4.5c	6.3±4.4c	1.3±1.3d	20.0±6.7a	0.0±0.0
Hb	Tamiz 2	80.0±6.9ab	98.8±1.3a	57.5±6.3a	61.3±6.7a	37.5±8.6a	26.3±8.6ab	15.0±6.6bc	7.5±2.6ab	0.0±0.0
Sf	Granel	52.5±7.2c	27.5±7.2d	13.8±5.9c	26.3±6.9cd	16.3±5.5b	23.8±6.9a	12.5±4.6bc	5.0±2.3bc	0.0±0.0
Sf	Tamiz 1	37.5±5.3c	8.8±2.7e	15.0±5.6c	22.5±6.0d	11.3±5.0bc	6.3±2.5bc	3.8±2.7bcd	1.3±1.3bc	0.0±0.0
Sf	Tamiz 2	47.5±6.0c	45.0±7.4c	26.3±5.3b	55.0±9.0ab	15.0±5.3b	47.5±10.6a	38.8±9.3a	8.8±3.8abc	0.0±0.0

**DDA: Días Después de la Aplicación; Medias con la misma letra en la misma columna no presentan diferencia significativa;  $\alpha \leq 0.05$ .**

**Cuadro 3.6.** Comparación del número promedio en porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* muertas por nivel de humedad del substrato y especie de nematodo mediante la prueba de Kruskal-Wallis, a través del tiempo

Especie	Porcentaje de Humedad	DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN								
		3	8	13	18	23	28	33	38	43
Hb	20	100±0.0a	75.0±8.3ab	50.0±5.3cd	15.0±6.7c	10.0±4.1c	10.0±4.1bc	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0
Hb	40	100±0.0a	90.0±6.7a	72.5±4.5a	55.0±3.3a	47.5±2.5a	35.0±4.1a	12.5±4.2a	10.0±4.1a	0.0±0.0
Hb	60	100±0.0a	80.0±8.2ab	57.5±5.3bc	35.0±4.1ab	30.0±3.3ab	15.0±4.1b	5.0±3.3bc	2.5±2.5b	0.0±0.0
Hb	80	100±0.0a	90.0±6.7a	50.0±5.3cd	22.5±4.5b	5.0±3.3cd	5.0±3.3c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0
Hb	100	97.5±2.5a	90.0±6.7a	55.0±3.3bc	15.0±5.5c	2.5±2.5d	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0
Sf	20	95.0±3.3a	75.0±8.3ab	35.0±4.1e	22.5±4.5b	20.0±3.3b	10.0±4.1bc	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0
Sf	40	100±0.0a	90.0±6.7a	60.0±4.1ab	40.0±4.1a	40.0±4.1a	27.5±5.8a	10.0±5.5ab	7.5±3.8a	0.0±0.0
Sf	60	97.5±2.5a	90.0±6.7a	62.5±4.2ab	40.0±4.1a	25.0±5.3b	15.0±4.1b	5.0±3.3bc	2.5±2.5b	0.0±0.0
Sf	80	97.5±2.5a	90.0±6.7a	55.0±5.0bc	12.5±5.6c	5.0±3.3cd	5.0±3.3c	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0
Sf	100	87.5±6.7b	67.5±6.5ab	45.0±7.3de	12.5±4.2c	7.5±3.8c	0.0±0.0d	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0

DDA: Días Después de la Aplicación; Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa; P≤0.05

### 3.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que la persistencia de las dos especies de nematodos evaluadas se ve influenciada por el tamaño de partícula del substrato en donde fueron aplicados, además de que requieren de un tiempo de adaptación en el cual su actividad es baja, necesariamente mientras inician la búsqueda de sus hospederos (las larvas del insecto cebo). Por lo anterior es factible el control biológico de la mosca negra con las especies de nematodos entomopatógenos, *H. bacteriophora* y *S.feltiae*, considerando que tienen una mejor persistencia en substratos con tamaños de partícula menores a 1mm equivalente a suelo de textura limosa y arcillosa (según el triángulo de texturas de suelo).

Molyneux y Bedding (1984) mencionaron que la dispersión de los nematodos entomopatógenos se encuentra restringida en los suelos más finos, ya que los poros son más pequeños y provocan una aireación pobre y una reducción en la cantidad de O<sub>2</sub> disponible para la respiración aeróbica de los nematodos (Burman y Pye, 1980), lo que conduce a que los nematodos reduzcan su eficacia para encontrar a su hospedero a través del CO<sub>2</sub> como señal química (Lewis *et al.*, 1993); lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en el experimento de tamaño de partícula, ya que en el Tamiz 2 (equivalente a una textura limosa y arcillosa) fue en donde se presentó mayor persistencia de nematodos de las especies *H. bacteriophora* y *S. feltiae*. Sin embargo hay que considerar que no es posible comparar las características presentes en un suelo con las que presenta un substrato.

En un experimento donde se evaluaron suelos franco arenosos con pH entre 4, 6, 8 y 10, la supervivencia y retención de la infectividad de las especies *S. carpocapsae* y *S. glaseri* fue mayor a un pH de 8. La supervivencia de ambas especies disminuyó considerablemente después de una semana a un pH de 10 (Georgis y Poinar, 1983). Estos resultados son consistentes con lo que se obtuvo

en nuestro experimento de tamaño de partícula ya que el tamiz 2 (equivalente a una textura limosa y arcillosa), en la prueba de laboratorio, resultó con el pH más elevado (7.7) y fue en el substrato donde persistieron mejor los nematodos de las dos especies evaluadas.

Brady (1974) mencionó que el porcentaje de oxígeno en el suelo disminuye con la profundidad, comparativamente, en suelos arcillosos o limosos la tasa de oxígeno disminuye más rápido que en los arenosos, por lo que éste puede ser un factor limitante en los suelos con alto contenido de materia orgánica o de arcilla (Kaya, 1990). A pesar de que en el experimento de tamaño de partícula, el Tamiz 2 presentó partículas de tamaño similar a las de los suelos arcillosos o limosos, su contenido de materia orgánica fue el menor (10.12%) sugiriendo que al no contener porcentajes elevados de materia orgánica no disminuyó rápidamente la cantidad de oxígeno en el substrato lo que ayudó a que los nematodos de ambas especies persistieran mejor en él.

Por otro lado, Baur y Kaya (2001) mencionaron que las especies de *Steinernema* persisten durante más tiempo que las de *Heterorhabditis* bajo condiciones de laboratorio y de campo. De igual manera, en el estudio realizado por Koppenhöfer y Fuzy (2006), donde se evaluó el efecto del tipo de suelo sobre la persistencia y efectividad de varias especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* y *H. bacteriophora*) ellos observaron que independientemente del tipo de suelo la persistencia fue menor en las especies de *Heterorhabditis* que en las de *Steinernema*. La explicación que dan los autores se basa en la cantidad de recursos energéticos presente en ellos que generalmente está relacionada con su tamaño, ya que *Heterorhabditis* es más pequeño que *Steinernema*. Sin embargo, en el experimento de tamaño de partícula del presente estudio no se presentó esa diferencia, ya que tanto *H. bacteriophora* como *S. feltiae* persistieron el mismo tiempo en el Tamiz 2, que fue

en el que se presentó mayor persistencia, a pesar de que los nematodos de la especie *H. bacteriophora* son más pequeños que los de *S. feltiae*.

La persistencia de nematodos en suelos arenosos, arenos arcillosos, franco arcilloso y arcillosos fue comparada por Kung *et al.* (1991) encontrando que la persistencia de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* fue menor en suelos de textura fina que en los de textura gruesa; lo cual concuerda con la suposición de que la supervivencia de los nematodos se ve afectada por la interacción de tipo de suelo, la humedad y la aireación (Wallace, 1971) la que es más corta en suelos de texturas más finas. Por el contrario, en el estudio de tamaño de partícula la textura fina no afectó la persistencia de ambas especies de nematodos ya que fue en donde mejor persistieron y funcionaron, sugiriendo nuevamente que no es conveniente comparar las características de un suelo con las de un sustrato.

En general, los nematodos entomopatógenos requieren de una película de agua para su actividad (Barbercheck, 1992). Consecuentemente, la distribución del tamaño de los poros y la distribución del agua en el espacio del poro, pueden afectar diferencialmente la actividad de estos organismos (Barbercheck, 1992). Kaya (1990) describió como la humedad del suelo tiene un gran impacto sobre la capacidad de búsqueda del hospedero y la actividad infectiva de los nematodos entomopatógenos, así como lo hacen la temperatura y textura del suelo y destacó que la humedad, es un factor central que afecta la actividad del nematodo en el suelo y la variabilidad en el control de la eficacia es atribuida a la ineficiencia de la humedad del suelo (Gaugler *et al.*, 1994). En suelos mojados o saturados, el movimiento de los nematodos entomopatógenos puede ser restringido debido a la poca tensión superficial necesaria para el movimiento (Womersley, 1990), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio en el experimento de contenidos de humedad, ya que a humedades del 80 y 100% en el sustrato, las dos especies de nematodos tuvieron menor persistencia.

Por otro lado, Kung *et al.* (1991) estudiaron el comportamiento de la especie *S. carpocapsae* en un suelo franco arenoso con diferentes grados de humedad, ellos observaron una tendencia a mejorar la sobrevivencia de esta especie con decrementos de humedades en el suelo, de igual manera, se estudió a la especie *S. glaseri* la cual tuvo una mejor sobrevivencia en el suelo con 4% de humedad. Así mismo, Grant y Villani (2003) también observaron mejoras en la persistencia de *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* en menores cantidades de humedad en el suelo.

Koppenhöfer y Fuzy (2007) realizaron un estudio de laboratorio en el cual evaluaron el efecto de la humedad del suelo sobre la infectividad y persistencia de los nematodos entomopatógenos, *S. scarabaei*, *S. glaseri*, *H. zealandica* y *H. bacteriophora*, concluyendo que las dos especies de *Heterorhabditis* persistieron mejor a -3000 kPa y menos a -10 kPa y que las dos especies de *Steinernema* persistieron a -10 kPa. En conclusión, la humedad del suelo puede tener diferentes efectos sobre las especies de nematodos entomopatógenos debido a diferencias en las adaptaciones fisiológicas y de comportamiento entre las especies. En general, se sugiere que todos los nematodos tienden a ser más eficientes en humedades moderadas del suelo y menos eficientes en suelos saturados o secos, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en el presente estudio de contenidos de humedad.

A manera de conclusión se puede señalar que la mayoría de los estudios que evalúan la persistencia de nematodos se han realizado en diferentes tipos de suelo, a diferencia del presente en el que se usó un substrato, infiriendo que se requieren de más estudios al respecto por lo contrastante de los resultados encontrados. En conjunto los resultados de ambos experimentos señalan que la persistencia de los nematodos entomopatógenos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* se ve influenciada por el tamaño de partícula y el contenido de humedad en el substrato. Tanto *H. bacteriophora* como *S. feltiae* persistieron mejor en el tamaño

de partícula pequeño (<1mm). Por otro lado, ambas especie persistieron mejor a niveles de humedad del 40%. Estos elemento son importantes considerarlos al momento de realizar un control biológico de la mosca negra *B. difformis* con nematodos entomopatógenos, específicamente con las especies *H. bacteriophora* y *S. feltiae*, para saber cuál es la especie más adecuada a las condiciones que se presentan en el ambiente en donde se quieren utilizar para asegurar su adaptación y de esta forma obtener un buen control.

## CAPÍTULO IV

### PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *Heterorhabditis bacteriophora* y *Sterneinema feltiae* SOBRE *B. difformis*

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

La mosca negra *Bradysia difformis* Frey (Diptera: Sciaridae) es una plaga de importancia económica en diferentes regiones del mundo, principalmente en cultivos bajo invernadero como son hortalizas y flores. En México, se ha detectado en diversas localidades productoras de nochebuena del centro del país: Zacatepec (estado de Morelos), Tetela del Monte (estado de Morelos), San Lorenzo Tlacotepec (estado de México), Tenango de las Flores (estado de Puebla); San Gregorio Atlapulco (Xochimilco, D. F.) (Villanueva segundo capítulo de esta tesis). La principal causa por la que se considera un problema fitosanitario grave es debido a que las larvas se alimentan de las raíces de las plántulas en semilleros o esquejes en proceso de enraizamiento, produciendo daños de diversa importancia económica, aún no cuantificados (García, 2008) y a que cuenta con habilidad para desarrollar resistencia a los plaguicidas (Lindquist *et al.*, 1985). El control de *B. difformis* en las zonas productoras de nochebuena se realiza normalmente con insecticidas debido a la rapidez de su efecto, facilidad de manejo, disponibilidad en el mercado y diversidad de presentaciones; sin embargo, a pesar de que algunos han mostrado eficacia, su uso frecuente ha generado resistencia de la plaga (CESAVEDF, 2008).

Por lo anterior, es que surge la necesidad de utilizar otras opciones de control. En este contexto, los nematodos entomopatógenos presentan ventajas sobre los insecticidas químicos como: no ser tóxicos para vertebrados, ambientalmente amigables, ser una estrategia sostenible, poseer la habilidad de buscar a su

insecto hospedero y reciclarse. La eficacia de los nematodos está estrechamente relacionada con el aislado o especie y con condiciones ambientales o técnicas de aplicación, por lo que no existen condiciones similares o comparables (Epsky y Capinera, 1993; Susurluk y Ehlers, 2008). Se ha documentado el uso de nematodos entomopatógenos en el control de diversas especies del género *Bradysia* con buenos resultados (Gougle y Hauge, 1995; Harris *et al.*, 1995; Mansillas *et al.*, 2001; Jagdale y Grewal, 2004; Jagdale *et al.*, 2007), por lo que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar en condiciones de laboratorio la patogenicidad y la virulencia de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae* sobre larvas y pupas de *B. difformis*.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres experimentos: uno para estudiar la patogenicidad y dos para estimar la virulencia, de las especies de nematodos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* sobre larvas y pupas de *B. difformis*. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México a temperatura ambiente (21-23°C).

### 4.2.1 Nematodos

*Steinernema feltiae* (ENTONEM ®) fue proporcionado por la empresa Koppert México y *Heterorhabditis bacteriophora* se obtuvo de la colección del laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. *H. bacteriophora* se multiplicó sobre larvas de último instar de *G. mellonella* (Woodring y Kaya, 1988) y los juveniles infectivos se obtuvieron en trampas de White (White, 1927). Ambas especies de nematodos fueron almacenadas en agua

destilada, en contenedores de plástico de 200 ml con tapa a temperatura ambiente (21-23°C).

#### **4.2.2 Insectos**

Las larvas y pupas de *B. difformis* (Diptera: Sciaridae) fueron obtenidas de la cría mantenida en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo bajo condiciones controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 75% de humedad y fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas de obscuridad) (para detalles de la cría ver capítulo II). En los bioensayos se usaron larvas de 3° o 4° instar, y pupas de 1 o 2 días de edad, seleccionadas de manera aleatoria.

#### **4.2.3 Desinfección de material biológico**

El proceso de desinfección consistió en separar bajo el microscopio estereoscópico larvas de 3° o 4° instar de *B. difformis* en grupos de 12 individuos. Cada grupo se colocó en una caja Petri de plástico de 50 mm la cual tenía en su base tela de organza. La caja Petri con los individuos se sumergió en hipoclorito de sodio al 0.1% por dos segundos, y posteriormente se enjuagaron en agua destilada estéril por otros dos segundos y por último se colocaron en una toalla de papel para eliminar el exceso de agua y secar a los individuos para ser utilizados en los bioensayos. El mismo proceso se realizó para las pupas de *B. difformis* de 1 o 2 días de edad.

#### **4.2.4 Unidad Experimental**

En los tres experimentos, la unidad experimental fue una placa de cultivo de tejidos con 12 orificios (SARSTEDT). En el experimento de patogenicidad y en el de virulencia en papel filtro, cada orificio contenía en su base círculos de papel filtro estéril; mientras que en el de virulencia en substrato se utilizó en vez de papel filtro el substrato a granel estéril que se utiliza en la zona de producción de nochebuena en Morelos (detalles de las características fisicoquímicas del substrato se describen el capítulo III), la unidad experimental se completo con una larva o una pupa de *B. difformis* (dependiendo del tratamiento) y juveniles infectivos de nematodos entomopatógenos. Las placas de cultivo de los testigos contenían lo descrito anteriormente a excepción de los nematodos entomopatógenos.

#### **4.2.5 Diseño experimental**

Todos los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar, para el experimento de patogenicidad se establecieron cuatro repeticiones y dos en los experimentos de virulencia (en papel filtro y en substrato), considerando una placa de cultivo como una repetición.

#### **4.2.6. Preparación de las unidades experimentales**

##### **4.2.6.1 Experimento de Patogenicidad**

La preparación de las placas consistió en colocar en su base dos círculos de papel filtro Whatman No. 4 humedecidos con 200 µl de agua destilada estéril, para mantener la humedad y evitar la desecación de los nematodos. Después en cada

orificio se depositaron 100 JI de nematodos entomopatógenos, dependiendo del tratamiento. Por último, en cada orificio se colocó una larva de mosca negra de 3° o 4° instar, previamente desinfectada. Este proceso también se realizó para los tratamientos que involucraron pupas de 1 o 2 días de edad de *B. difformis*. En las placas de los testigos únicamente se depositó agua destilada estéril.

#### **4.2.6.2 Experimentos de Virulencia**

La virulencia de los nematodos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* sobre lavas y pupas de *B. difformis* se estimó a través de dos experimentos utilizando la técnica propuesta por Morris *et al.* (1990). En el primer experimento se utilizó como medio papel filtro y en el segundo substrato a granel (el mismo que se usó en los experimentos descritos en el Capítulo III de esta tesis).

En el experimento de virulencia en papel filtro, las placas de cultivo se prepararon como se describió en el experimento de patogenicidad. Por otro lado, en el experimento de virulencia en substrato, los orificios de las placas se llenaron con 2 gr de substrato a granel estéril, el cual se humedeció con agua destilada estéril suficiente para lograr 40% de humedad (ver detalles de la determinación del porcentaje de humedad en el Capítulo III de esta tesis). Posteriormente, para los dos experimentos, se depositaron diferentes concentraciones de JI de nematodos entomopatógenos en las placas de cultivo. Las concentraciones de JI fueron: 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 JI por orificio. Finalmente se colocó una larva o bien una pupa de *B. difformis* por orificio, dependiendo del tratamiento. En los dos experimentos, la concentración de JI fue ajustada por diluciones volumétricas. En las placas de los testigos de los dos experimentos únicamente se depositó agua destilada estéril.

## **4.2.7 Definición de tratamientos**

### **4.2.7.1 Experimento de Patogenicidad**

Los tratamientos consistieron en dos estados de desarrollo de *B. difformis*: larva y pupa, dos especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema feltiae* ENTONEM ® y *Heterorhabditis bacteriophora*) y dos testigos generales, con cuatro repeticiones. En total se evaluaron seis tratamientos. Este experimento tiene un arreglo factorial de tratamientos 2x2, con dos factores: estados de desarrollo de *B. difformis* (con dos niveles) y especies de nematodo (con dos niveles), al que se le adicionaron dos testigos generales.

### **4.2.7.2 Experimentos de Virulencia**

En cada experimento se evaluaron 28 tratamientos los cuales consistieron en 7 concentraciones de juveniles infectivos de cada especie de nematodo entomopatógeno y dos estados de desarrollo de *B. difformis* (larva y pupa) y 14 testigos generales con dos repeticiones cada uno, considerando una placa como repetición.

## **4.2.8 Variable evaluada**

En los tres experimentos se evaluó la mortalidad de larvas y de pupas de *B. difformis* en cada tratamiento. En el experimento de patogenicidad las evaluaciones se realizaron cada 24 horas durante 5 días. En los experimentos de virulencia (en papel filtro y en substrato) se registró la mortalidad a las 120 horas después del establecimiento.

#### **4.2.9 Análisis estadístico**

Los tres experimentos se repitieron dos veces en el tiempo considerando una generación diferente de larvas y pupas de mosca negra (*B. difformis*) y un lote diferente de nematodos entomopatógenos. En cada ocasión, los tratamientos se establecieron el mismo día.

##### **4.2.9.1 Experimento de Patogenicidad**

El análisis de los resultados obtenidos se realizó en dos partes. Primero se comparó entre estados biológicos, o sea, entre larvas y pupas, en donde se combinaron los datos de mortalidad en las dos especies de nematodos. Posteriormente, debido a que ambas especies de nematodos causaron el 100% de mortalidad en larvas, únicamente se comparó la mortalidad causada por ambas especies de nematodos en pupas. Los tratamientos testigo no se consideraron en el análisis ya que no se presentó mortalidad. Los análisis se realizaron mediante Regresión Logística con el paquete GenStat Versión 8 (Payne *et al.*, 2005)

##### **4.2.9.2 Experimentos de Virulencia**

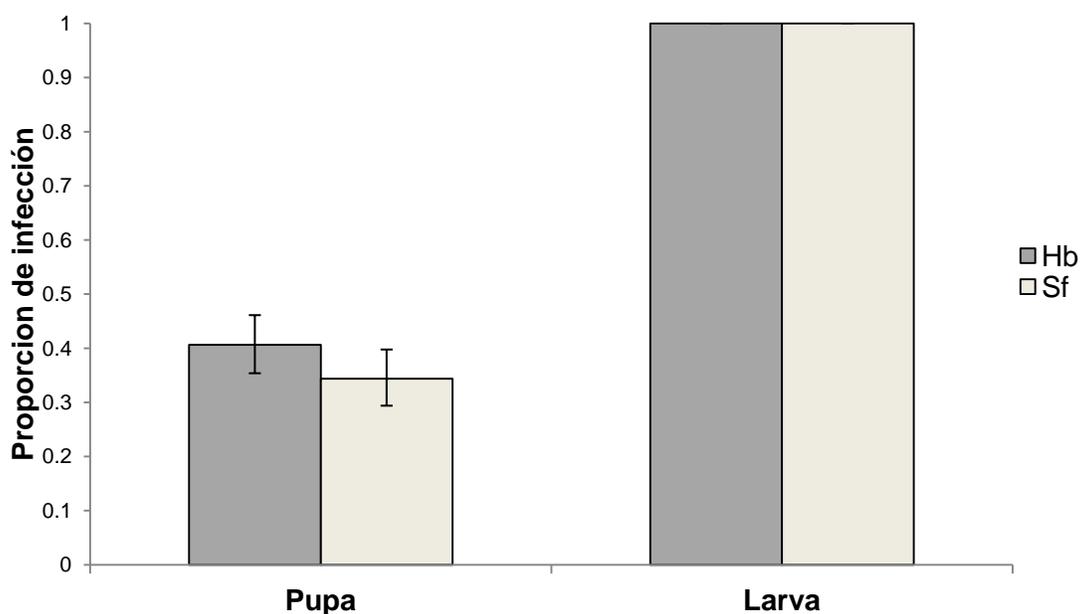
Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos se procesaron utilizando el Modelo Generalizado Lineal (GLM) con error binomial y Análisis Probit de Modelos Paralelos con el paquete estadístico GenStat versión 8 (Payne *et al.*, 2005). Se trabajó bajo el supuesto que el número de larvas y pupas infectadas siguieron una distribución binomial con tamaños de muestras iguales al número de larvas y pupas examinadas. Primero, una línea simple fue ajustada a los datos de todos los tratamientos. Segundo, se permitió la variación de los interceptos y tercero se permitió la variación de las pendientes. La concentración causando el 50% de

infección de larvas y pupas ( $CL_{50}$ ) fue estimada de los mejores modelos para cada  $CL_{50}$  calculada de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller, 1944). En el análisis estadístico los datos se agruparon en cuatro tratamientos para cada experimento (1: Larva y *H. bacteriophora*, 2: Larva y *S. feltiae*, 3: Pupa y *H. bacteriophora*; 4: Pupa y *S. feltiae*).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Experimento de Patogenicidad

Las dos especies de nematodos entomopatógenos evaluadas (*H. bacteriophora* y *S. feltiae*) no mostraron diferencias significativas ( $F_{1, 30} = 1549.91$ ,  $P < 0.001$ ) en sus niveles de patogenicidad sobre los estados biológicos de la mosca negra *B. difformis*, esto es entre larvas y pupas. La mayor mortalidad, en ambas especies, se obtuvo en larvas con una proporción de 1 equivalente a 100%, mientras que en pupas la proporción fue cercana al 0.4 equivalente a aproximadamente 40% (Figura 4.1). Por otro lado, tampoco se presentó una diferencia significativa entre las especies de nematodos entomopatógenos sobre pupas de *B. difformis* ( $F_{1,14} = 3.19$ ,  $P = 0.096$ ), es decir, la mortalidad que ocasionó *H. bacteriophora* fue muy similar a la que ocasionó *S. feltiae* con una proporción cercana al 0.4 aproximadamente (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Proporción de larvas y pupas de *B. difformis* infectadas por los nematodos *H. bacteriophora* y *S. feltiae*. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% transformados a partir de la escala logística. Hb: *H. bacteriophora*; Sf: *S. feltiae*.

### 4.3.2 Experimentos de Virulencia

#### 4.3.2.1 En Papel Filtro

El análisis de datos agrupados comparando los tratamientos mostró diferencias significativas entre los interceptos ( $F_{3,41}= 11.60$ ,  $P<0.001$ ) y diferencias en las pendientes ( $F_{3,41}=5.13$ ,  $P=0.004$ ), sugiriendo diferencias en los niveles totales de virulencia (Cuadro 4.1).

El Tratamiento 1 que involucró larvas de *B. difformis* y el nematodo *H. bacteriophora* fue el más virulento al requerir el menor número de JI para provocar el 50% de mortalidad, mientras que el Tratamiento 3 que involucró pupas de *B. difformis* y el nematodo *H. bacteriophora* fue el menos virulento al requerir la

mayor cantidad de JI (Cuadro 4.1). El número de juveniles infectivos (JI) requeridos para obtener el 50% de mortalidad de individuos de *B. difformis* en cada uno de los tratamientos fue de 15, 27, 196 y 53, respectivamente (Cuadro 4.1).

**Cuadro 4.1.** Virulencia (LC<sub>50</sub>s en escala logarítmica con intervalos de confianza del 95%) de los cuatro tratamientos contra *B. difformis* en papel filtro. RC= coeficiente de regresión (pendiente).

Tratamiento	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>50</sub> (nematodos/individuo)	Intercepto (SE)	RC (SE)
1-LHb	1.17 (1.062-1.309)	15	-1.555 (0.148)	1.320 (0.129)
2-LSf	1.44 (1.210-1.825)	27	-1.846 (0.261)	1.281 (0.213)
3-PHb	2.29 (1.836-3.439)	196	-1.389 (0.153)	0.605 (0.129)
4-PSf	1.72 (1.496-2.128)	53	-1.861 (0.220)	1.078 (0.176)

LHb: Larva y *H. bacteriophora*; LSf: Larva y *S. feltiae*; PHb: Pupa y *H. bacteriophora*; PSf: Pupa y *S. feltiae*.

#### 4.3.2.2 En Substrato

El análisis de datos agrupados comparando los tratamientos mostró diferencias significativas entre los interceptos ( $F_{3,48}= 7.89$ ,  $P<0.001$ ), pero ninguna diferencia entre las pendientes ( $F_{3,48}=0.27$ ,  $P=0.845$ ), sugiriendo diferencias en los niveles totales de virulencia (Cuadro 4.2).

El Tratamiento 2 que involucró larvas de *B. difformis* y el nematodo *S. feltiae* fue el más virulento; sin embargo, el Tratamiento 1 que involucró larvas de *B. difformis* y el nematodo *H. bacteriophora* también resultó virulento, ya que el número de JI requeridos para obtener el 50% de mortalidad de larvas de *B. difformis* fue de 37 y 35, respectivamente, siendo pequeña la diferencia (Cuadro 4.2). Por otro lado, el

Tratamiento 4 que involucró pupas de *B. difformis* y el nematodo *S. feltiae* fue el menos virulento al requerir la mayor cantidad de JI (Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2.** Virulencia (LC<sub>50</sub>s en escala logarítmica con intervalos de confianza del 95%) de los cuatro tratamientos contra *B. difformis* en sustrato. RC= coeficiente de regresión (pendiente).

Tratamiento	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>50</sub> (nematodos/individuo)	Intercepto (SE)	RC (SE)
1-LHb	1.56 (1.402-1.759)	37	-1.663 (0.122)	1.05 (0.0815)
2-LSf	1.55 (1.387-1.741)	35	-1.645 (0.121)	1.05 (0.0815)
3-PHb	1.79 (1.615-2.014)	62	-1.905 (0.129)	1.05 (0.0815)
4-PSf	2.07 (1.865-2.327)	118	-2.199 (0.139)	1.05 (0.0815)

LHb: Larva y *H. bacteriophora*; LSf: Larva y *S. feltiae*; PHb: Pupa y *H. bacteriophora*; PSf: Pupa y *S. feltiae*.

## 4.4 DISCUSIÓN

### 4.4.1 Patogenicidad

Los nematodos entomopatógenos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* provocaron mortalidad tanto de larvas como de pupas de *B. difformis*. Sin embargo, el estado biológico más susceptible fue el de larva, debido posiblemente a que las larvas presentan aberturas naturales (boca, ano, espiráculos) por las cuales los nematodos pueden penetrar fácilmente en comparación a las pupas que al ser un estado de reposo necesario para la formación del adulto pueden carecer de algunas de ellas. *B. difformis* presenta una pupa del tipo obtecta, que se caracteriza por presentar los apéndices visibles pero pegados al cuerpo lo que también pudo haber provocado que los nematodos no encontraran puntos de fácil penetración (Cabezas, 2003). Aunado a esto, existen diversos reportes de estudios en los cuales se han utilizado nematodos entomopatógenos para el

control de moscas negras del género *Bradysia* los cuales demuestran que las larvas son susceptibles y en los cuales se han obtenido mortalidades cercanas al 100% (Lindquist y Piatkowski, 1993; Gougle y Hauge, 1995; Harris *et al.*, 1995; Mansillas *et al.*, 2001; Jagdale y Grewal, 2004; Jagdale *et al.*, 2007). Por otro lado, Harris *et al.* (1995) probaron el aislado SN de *S. feltiae* contra *B. coprophila* y concluyeron que se redujo significativamente el número de larvas, obteniendo un 80% de mortalidad, además de que el segundo y cuarto instar larval fueron más susceptibles que las pupas. Los resultados obtenidos por estos autores son consistentes con lo obtenido en nuestro experimento. Implicando que ya conociendo que tanto *H. bacteriophora* como *S. feltiae* causan mortalidad de larvas y pupas de *B. difformis* se realicen experimentos en campo para corroborar esta información y pueda evaluarse el potencial que representan estas especies de nematodos en el control biológico de *B. difformis*, considerando que se debe de sincronizar la aplicación de los nematodos con la aparición principalmente de larvas. Por otro lado, *H. bacteriophora* es una especie adaptada al calor que causa infecciones entre 10 y 32°C y se reproduce entre 15 y 30°C. En contraste, *S. feltiae* es una especie adaptada al frío que causa infecciones entre 8 y 30°C y se reproduce entre 19 y 25°C (Grewal *et al.*, 1994). Estos datos también deben de considerarse en los programas de control biológico de *B. difformis* en el cultivo de nochebuena en las zonas productoras del centro del país, ya que dependiendo de las condiciones presentes en los invernaderos en los que se desea realizar el control de esta mosca negra, se elegirá la especie de nematodo mejor adaptada a esas condiciones.

#### **4.4.2 Virulencia**

##### **4.4.2.1 En papel filtro**

*H. bacteriophora* resultó más virulenta en larvas en comparación a *S. feltiae*, caso contrario a lo sucedido en pupas, ya que *S. feltiae* fue más virulenta que *H.*

*bacteriophora*, sugiriendo que probablemente *H. bacteriophora* tiene mayor preferencia por larvas de *B. difformis* que por pupas, a diferencia de *S. feltiae* que prefiere pupas en lugar de larvas. También podemos inferir que *H. bacteriophora* al ser considerada una especie navegadora y altamente móvil (Cui *et al.*, 1993) detecta fácilmente el CO<sub>2</sub> y los productos de excreción que van liberando las larvas de *B. difformis* y que les sirven de guía para localizarlas, no siendo un impedimento la alta movilidad que presentan las larvas (Gaugler *et al.*, 1980). Por otro lado, *S. feltiae* es considerada una especie asechadora y poco móvil (Cui *et al.*, 1993) por lo que le fue más sencillo localizar a las pupas, las cuales no son móviles. En relación a esto, diversos autores han mencionado que la virulencia de los nematodos entomopatógenos puede estar influenciada por factores tales como el número de JI invasores y de células liberadas de la bacteria simbiótica, la velocidad de multiplicación y el comportamiento evasivo y agresivo de las larvas, que se relaciona con la capacidad de los JI para encontrar y penetrar al insecto hospedero, lo cual puede contribuir con el fracaso o éxito del parasitismo (Steven *et al.*, 1992; Gaugler *et al.*, 1994; Aydin y Susurluk, 2005).

#### **4.4.2.2 En substrato**

En este caso, ambas especies de nematodos (*H. bacteriophora* y *S. feltiae*) resultaron altamente virulentas en larvas, sugiriendo que independientemente del tipo de comportamiento que presentan los nematodos y de la capacidad de movimiento de las larvas, en este medio los juveniles infectivos pudieron localizar a sus hospederos, debido probablemente a que es el medio natural tanto de los nematodos como de la mosca negra. En pupas, *H. bacteriophora* resultó más virulenta que *S. feltiae* sugiriendo que hubo influencia de la capacidad de búsqueda que tiene *H. bacteriophora* para localizar a sus hospederos siendo más fácil en substrato que en papel filtro. Aunado a esto, Gaugler y Kaya, (1990) mencionaron que la búsqueda de los nematodos hacia su hospedero podría

concentrarse en la selección hacia ciertos insectos o estados de desarrollo y por tanto su localización física a través del suelo serviría como una clave selectiva para la localización de su hospedero.

En conclusión, *H. bacteriophora* y *S. feltiae* son una buena opción para el control biológico principalmente de larvas de *B. difformis* en el cultivo de nochebuena; sin embargo, se sugiere que se realicen más pruebas para conocer su efecto bajo condiciones de campo, ya que en un futuro estos nematodos pueden adaptarse y ser activos a ciertas temperaturas y niveles de humedad para poder sobrevivir y moverse en un particular tipo de suelo, incluso para evitar a sus depredadores.

## CONCLUSIONES GENERALES

En total se colectaron 2,141 ejemplares en los cinco sitios de colecta de las zonas productoras de nochebuena del centro de México. La especie más abundante fue *Bradysia difformis* Frey (99.5%) y sólo se colectaron 9 ejemplares que correspondieron a tres especies no identificadas de *Bradysia* y un ejemplar de un género no identificado. En la localidad de Tenango de las Flores Puebla se colectó el mayor número de ejemplares (711); seguida por Zacatepec, Morelos con 424; Tetela del Monte, Morelos con 389; San Lorenzo Tlacotepec Atlacomulco, Estado de México con 377 y San Gregorio Atlapulco Xochimilco, D.F. con 240.

De los ejemplares colectados de *B. difformis* el 75% fueron machos, por lo que se establece que la relación sexual en campo es de tres machos por cada hembra.

Se caracterizaron los estados de desarrollo de *B. difformis* por ser la especie más abundante y se diferenciaron morfométricamente sus estadios larvales. Los límites en la anchura de la cápsula cefálica de las larvas del estadio I de *B. difformis* van de 62 a 102.98  $\mu\text{m}$ . Para el estadio II los límites son de 102.99 a 214.42  $\mu\text{m}$  y para los estadios III y IV los límites van de 214.43 a 245.36  $\mu\text{m}$  y de 245.37  $\mu\text{m}$  en adelante, respectivamente.

La persistencia de los nematodos entomopatógenos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* se ve influenciada por el tamaño de partícula y el contenido de humedad en el sustrato. Los nematodos de la especie *H. bacteriophora* presentaron mayor persistencia que los nematodos de la especie *S. feltiae* independientemente del tamaño de partícula y del contenido de humedad del sustrato a través del tiempo. Considerando el tamaño de partícula y el contenido de humedad del sustrato, tanto *H. bacteriophora* como *S. feltiae* persistieron mejor en el Tamiz 2 (<1mm) y en un nivel de humedad del 40%.

Los nematodos entomopatógenos *H. bacteriophora* y *S. feltiae* son patogénicos tanto en larvas (mortalidades del 100%, por ambas especies) como en pupas (mortalidades cercanas al 40%, por ambas especies) de *B. difformis*, siendo las larvas las más susceptibles. Las dos especies no mostraron diferencias significativas en sus niveles de patogenicidad sobre los estados biológicos de la mosca negra *B. difformis*.

En las pruebas de virulencia en papel filtro, la especie *H. bacteriophora* resultó más virulenta en larvas de *B. difformis* en comparación a *S. feltiae*, caso contrario a lo sucedido en pupas, ya que *S. feltiae* fue más virulenta que *H. bacteriophora*.

En las pruebas de virulencia en substrato ambas especies de nematodos, *H. bacteriophora* y *S. feltiae*, resultaron altamente virulentas en larvas de *B. difformis*, mientras que en pupas *H. bacteriophora* resultó más virulenta que *S. feltiae*.

## LITERATURA CITADA

- Aguilera, M. M. & G. C. Jr. Smart.** 1993. Development, reproduction and pathogenicity of *Steinernema scapterici* in monoxenic culture with different species of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 289-294.
- Akhurst, R. J. & N. E. Boemare.** 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology*, 134: 1835-1845).
- Akhurst, R. J. & N. E. Boemare.** 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, Fl. CRC Press, pp. 75-79.
- Amarashinge, L. D., W. M. Hominick, B. R. Briscoe & A. P. Reid.** 1994. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *Journal of Helminthology*, 68: 277-286.
- Aydin, H. & A. Susurluk.** 2005. Competitive abilities of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the same host at different temperatures. *Turkish Journal of Biology*, 29: 35-39.
- Barbercheck, M. E.** 1992. Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. *Florida Entomologist*, 75(4): 539-548.
- Barbercheck, M. E. & J. Wang.** 1996. Effect of cucurbitacin D on *in vitro* growth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 141-145.
- Baur, M. E. & H. K. Kaya.** 2001. Persistence of entomopathogenic nematodes. In: Baur, M. E. & J. Fuxa. Environmental Persistence of Entomopathogens and Nematodes (Southern Cooperative Series Bulletin 398). OK Agricultural Experiment Station, Stillwater OK, pp. 1-47.

- Bergley, J. W.** 1990. Efficacy against insect in habitats other than soil. *In: Gaugler, R & H. K. Kaya (eds). Entomopathogenic nematodes in biological control.* 215-231 pp. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Binns, E. S.** 1973. Fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae, Sciaridae) and the role of mycophagy in soil: a review. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*,18: 77-90.
- Bird, A. F. & R. J. Akhurst.** 1983. The natural of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal Parasitology*, 13: 599-606.
- Bird, A. & J. Bird.** 1991. The structure of nematodes. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, 326 p.
- Blaschke Berthold, U.** 1988. Larval taxonomy in Sciaridae (Insecta, Diptera, Mycetophiloidea). *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, 30: 345-351.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst & R. G. Mourant.** 1996. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of System Bacteriology*, 43: 249-255.
- Brady, N. C.** 1974. The nature and properties of soils. New York: MacMillan. 639 p.
- Broen, B. V. et al.** 2009. *Manual of Central American Diptera.* Volume I. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada. 714 pp.
- Burman, M. & A. E. Pye.** 1980. *Neoplectana carpocapsae*: respiration of infective juvenile. *Nematologica*, 26: 214–219.
- Cabezas, M. F. A.** 2003. Introducción a la Entomología. Ed. Trillas. México, D. F. 148 pp.
- Cabrera, R. J., F. M. Morán & R. Q. Torres.** 2006. Producción de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch. en Morelos. Folleto Técnico No. 23, pp. 20.

- Campbell, L. R. & R. Gaugler.** 1991. Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *International Journal Parasitology*, 21: 219-224.
- Choo, H. Y., H. K. Kaya & S. P. Stock.** 1995. Isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea. *Japanese Journal of Nematology*, 25(1): 44-51.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEDF).** 2008. Plagas y Enfermedades del cultivo de nochebuena en el Distrito Federal. México, D. F. 25 pp.
- Coscarón-Arias, C. & S. Ibáñez-Bernal.** 2002. Number of larval instars of *Simulium (Psilopelmia) haematopotum* (Diptera: Simuliidae). *The Entomological News*, 113: 15-20.
- Cui, L.; R. Gaugler & Y. Wang.** 1993. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 73-78.
- Downing, A. S.** 1994. Effect of irrigation and spray volume on efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, 87: 643-646.
- Drees, B. M.** 1994. *Fungus gnats management*. Texas Agricultural Extension Service, Texas University. <http://insects.tamu.edu/extension/bulletins/uc//uc-028.html>.
- Drooz, A. T.** 1965. Elmspan worm head capsule widths and instars. *Journal of Economic Entomology*, 58: 629-631.
- Dunphy, G. B. & J. M. Webster.** 1988. Virulence mechanisms of *Heterorhabditis heliothidis* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens* in non-immune larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *International Journal Parasitology*, 18: 729-737.
- Dyar, H. G.** 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche*, 5: 420-422.

- Elliot, E. T. & D. Coleman.** 1988. Let the soil work for us. *Ecology Bulletin*, 39: 23-32.
- Endo, B. Y. & W. R. Nickle.** 1991. Ultrastructure of the intestinal epithelium, lumen and associated bacteria in *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal Helminthology Society*. Washington, 58: 202-212.
- Epsky D. N. & L. J. Capinera.** 1993. Quantification of Invasion of Two Strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into Three Lepidopteran Larvae. *Journal of Nematology*, 25(2): 173-180.
- Evans, A. A. F. & R. N. Perry.** 1979. Survival strategies in nematodes. *In*: Crool, N. A. (eds.). *The organization of Nematodes*. pp. 383-401. London Academic Press.
- Evans, A. A. F. & C. Womersley.** 1980. Longevity and Survival in nematodes: Models and mechanisms. *In*: B. M. Zuckerman (ed.). *Nematodes as biological models*. Vol. 2, 193-211. Academic Press, New York.
- Fox, R. C., S. C. Anderson & I. W. Alton.** 1972. Larval head capsules of the Nantucket pine tip moth. *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 513-514.
- Freeman, P.** 1983. *Sciarid flies, Diptera; Sciaridae*. Handbooks for the identification of British insects 9, Part 6. London Royal Entomological Society. 68 pp.
- Frouz, J., A. Arshad & J. R. Lobinske.** 2002. Suitability of morphological parameters for instar determination of pestiferous midges *Chironomus crassicaudatus* and *Glyptotendipes paripes* (Diptera:Chironomidae) under laboratory conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18: 222-227.
- Galicia A. B. J., L. Trejo & A. Valdéz.** 2001. Shade intensity and its effect in morphology and physiology of poinsettia *Euphorbia pulcherrima*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7: 143-149.
- García, P. F.** 2008. *Fungus gnat*. Insecto plaga en ornamentales. INIFAP.

- Gaugler, R. L., B. Lebeck & G. M. Boush.** 1980. Orientation of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environmental Entomology*, 9: 649-652.
- Gaugler, R.** 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insect pests with entomopathogenic nematodes. *Agricultural Ecosystem Environmental*, 24(1-3): 351-360.
- Gaugler R. & H. K. Kaya,** 1990. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. ISBN 0-8493-4541-3. 53 pp.
- Gaugler, R., E. Lewis & R. J. Stuart.** 1994. Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*. 109: 483-489.
- Gaugler, R.: Y. Wang, & J. F. Campbell.** 1994. Aggressive and Evasive Behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae Defenses Against Entomopathogenic Nematode Attack. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 193-199.
- Gougle, D. H. & N. G. M. Hauge.** 1995. Glasshouse control of fungus gnats, *Bradysia paupera*, on fuchsias by *Steinernema feltiae*. *Fundamental & Applied Nematology*, 18: 77-80.
- Georgis, R. & G. O. Poinar.** 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 15: 308-311.
- Georgis, R. & G. O. Jr. Poinar.** 1989. Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: A. R. Leslie & E. P. A. U. S. (eds.). Hybook of integrated pest management for turf and ornamentals. Pp. 447-489. Boca Raton, F. L. CRC Press.
- Georgis, R.** 1990. Formulation and application technology, pp. 173-191. In: Gaugler, R. & H. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

- Georgis, R. & R. Gaugler.** 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 84: 713-720.
- Georgis, R., H. K. Kaya & R. Gaugler.** 1991. Effect of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Environmental Entomology*, 20(3): 815-822.
- Georgis, R.** 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 83-99.
- Georgis, R. & S. A. Manweiler.** 1994. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. *Agricultural Zoology Review*. In: K. Evans (ed.) Department Entomology and Nematology. (AFRC Institute of Arable Crops Research, Rothamsted Experimental Station. Harpenden Herts, UK. Vol. 6, 63-94).
- Georgis, R. & H. K. Kaya.** 1998. Formulation of entomopathogenic nematodes in formulation of Microbial Biopesticides. Klumer Academic Dordrecht. pp: 289-308.
- Glazer, I.** 1996. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 373-378.
- González, V., R. Roche & M. E. Simanca.** 1984. Ciclo de vida de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae), plaga de granos almacenados. *Ciencias de la Agricultura*, (Cuba), 21: 25-30.
- Grant, J. A. & M. G. Villani.** 2003a. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology*, 32: 80–87.
- Grant, J. A. & M. G. Villani.** 2003b. Effects of soil rehydration on the virulence of entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology*, 32: 983–991.
- Grewal, P. S., E. E. E. Lewis, R. Gaugler & J. F. Campbell.** 1994. Host finding behavior as a predictor for foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*. 108: 207-215.

- Grewal, P. S.; S. Selvan & R. Gaugler.** 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-253.
- Grewal, P. S., M. Matsuura & V. Converse.** 1997. Mechanisms of specificity of association between the nematode *Steinernema scapterisci* and its symbiotic bacterium. *Parasitology*, 114: 483-488.
- Grewal, P. S. & R. Georgis.** 1999. Entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F. R. & J. J. Menn (eds.). *Methods Biotechnology. Biopesticides: Uses and Delivery* (pp. 271-299). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Grewal, P. S., R. U. Ehlers & D. I. Shapiro-Ilan (eds).** 2005. *Nematodes as Biocontrol Agents*, CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 505pp.
- Gray, P. A. & D. T. Johnson.** 1983. Survival of the nematode *Neoaplectana carpocapsae* in relation to soil temperature, moisture and time. *Journal Georgia Entomology Society*, 18: 454-460.
- Harlan, D. P., S. R. Dutky, G. R. Padgett, J. A. Mitchell, Z. A. Shaw & F. J. Bartlett.** 1971. Parasitism of *Neoaplectana dutkyi* in white-fringed beetle larvae. *Journal of Nematology*, 3: 280-283.
- Harris, M. A., R. D. Oetting & A. G. Gardner.** 1995. Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture. *Biological Control*, 5: 412-418.
- Hominick, W. M., B. R. Brioscoe., F. G. del Pino; J. Heng, D. J. Hunt, E. Kozodoi, Z. Mracek, K. B. Nguyen, A. P. Reid, S. Spiridonov, S. P. Stock, D. SSturhan, C. Waturu & M. Yoshida.** 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.
- Hominick, W. M. 2002.** Biogeography V: Entomopathogenic Nematology. *In*: Gaugler, R (ed). Wallingford, UK, CABI Publishing: 115-143.

- Hunter, Ch. D.** 1997. Suppliers of beneficial organisms in North America. California Environmental Protection Agency. Environmental Monitoring and Pest Management Branch. Sacramento, CA., 32p.
- Ibáñez-Bernal, S.** 1999. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. I. *Brumptomyia* França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de *L. (Lutzomyia)* França y del grupo *Verrucarum*. *Folia Entomologica Mexicana*, (107): 61-118.
- Ignoffo, C. M & D. L. Hostetter.** 1977. Environmental stability of microbial insecticides. Symposium Entomology Society American Minneapolis, MN. Miscelan Publication Entomology Society American, 10: 1-80.
- Jagdale, G. B.; M. L. Casey; P. S. Grewal & R. K. Lindquist.** 2004. Application rate and timing, potting medium and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biological Control*, 29: 296-305.
- Jagdale, G. B.; M. L. Casey & P. S. Grewal.** 2007. Effect of entomopathogenic nematode species, split application and potting medium on the control of the fungus gnat, *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae), in the greenhouse at alternating cold and warm temperatures. *Biological Control*, 43: 23-30.
- James, R. L., Dumroese, R. K. & D. L. Wenny.** 1995. *Botrytis cinerea* carried by adults Fungus gnats (Diptera; Sciaridae) in container nurseries. *Tree Planter's Notes*, 46: 49-53.
- Jones, D., R. H. Russnak, R. J. Kay & E. P. M. Candido.** 1986. Structure, expression and evolution of a heat shock gene locus in *Caenorhabditis elegans* that is flanked by repetitive elements. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 12006-120015.
- Kain, W. M., T. K. Wyeth & A. J. Kale.** 1981. Preliminary field studies on the use of an indigenous parasitic nematode for the control of porina. *Proceeding New Zeland Weed Pest Control Conference*, 34: 173-175.

- Kaya, H. K.** 1990. Soil ecology. *In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds).* Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93–116.
- Kaya, H. K.** 1993. An overview of insect parasitic nematodes. Austria: CSIRO, Publications. 1-10 pp.
- Kaya, H. K. & R. Gaugler.** 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Kaya, H. K. & A. M. Koppenhöfer.** 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science Technology*, 6: 333-345.
- Kennedy, M. K.** 1973. A culture method for *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 66: 1163-1164.
- Klein, M. G.** 1990. Efficacy against soil-inhabiting insects pest. *In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds).* Entomopathogenic nematodes in biological control (pp.195-214). Boca Raton FL. CRC Press.
- Koppenhöfer, A. M., H. K. Kaya & S. Taormino.** 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 193–199.
- Koppenhöfer, A. M. & M. E. Fuzy.** 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 11–22.
- Koppenhöfer, A. M. & M. E. Fuzy.** 2007. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*, 35: 128–139.
- Kung, S. P., R. Gaugler & H. K. Kaya.** 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 401-406.

- Kung, S. P., R. Gaugler & H. K. Kaya.** 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 242–249.
- Leath, K. T & R. C. Newton.** 1969. Interaction of a fungus gnat, *Bradysia* sp. (Sciaridae) with *Fusarium* spp. On alfalfa and red clover. *Phytopathology*, 59: 257-258.
- Lewis, L. C. & E. S. Raun.** 1978. Laboratory and field evaluation of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* for control of the European corn borer. *Ostrinia nubilalis*. *Iowa State Journal Research*, 52: 391-396.
- Lewis, E. E., R. Gaugler & R. Harrison.** 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology*, 71: 765–769.
- Lindquist, R. K., W. R. Faber., M. L. Casey.** 1985. Effect of various soil root media and insecticides on fungus gnats. *Horticultural Science*, 20(3): 358-360.
- Lindquist, R. & J. Piatkowski.** 1993. Evaluation of entomopathogenic nematodes for control of fungus gnat larvae. Bull. Int. Organiz. *Biological Integration Control Noxious Animals and Plants*, 16: 97-100.
- Mansilla, J. P., M. I. Pastoriza & R. Pérez.** 2001. Estudio sobre la biología y control de *Bradysia paupera* Tuomikoski (= *Bradysia difformis* Frey) (Diptera: Sciaridae). *Bolletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 27: 411-417.
- Menzel, F. & W. Mohring.** 2000. Revision der paläarktischen Trauermücken (Diptera, Sciaridae). *Studia dipterologica, Supplement* 6: 1-761.
- Menzel, F., J. E. Smith & N. B. Colauto.** 2003. *Bradysia difformis* Frey and *Bradysia ocellaris* (Comstock): Two additional Neotropical species of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of economic importance: A redescription and review. *Annals of the Entomological Society of America*, 96: 448-457.
- Mohammed, S. M. G.** 2011. Determination of larval instars of black cutworm *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4: 173-176.

- Molyneux, A. S. & R. A. Bedding.** 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica*, 30: 358–365.
- Molyneux, A. S.** 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (*Neoaplectana*) spp.: Temperature, and aspects of behavior and infectivity. *Experimental Parasitology*, 62: 169-180.
- Moore, J. C., D. E. Walter & H. W. Hunt.** 1988. Arthropod regulation of micro and mesobiota in below ground detrital food webs. *Annual Review of Entomology*, 33: 419-439.
- Morris, O. N.** 1885. Susceptibility of 31 species of agricultural insects pest to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Entomology*, 117: 401-401.
- Morris, O. N., V. Converse & J. Harding.** 1990. Virulence of entomopathogenic nematode-bacteria complexes for larvae of noctuids, a geometrid and a pyralid. *Canadian Entomologist*, 122: 309-320.
- Nishimsura, Y., A. Hagiwara, T. Suzuki & S. Yamanaka.** 1994. *Xenorhabdus japonicus* sp. Nov. Associated with the nematode *Steinernema kushidai*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 10(2): 207-210.
- Ortiz, V. B. & C. A. S. Ortiz.** 1990. Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. México. 394 p.
- Payne, R. W.; D. A. Murray; S. A. Harding; D. B. Baird & D. M. Soutar.** 2005. GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead.
- Poinar, G. O.** 1972. Nematodes as facultative parasites of insects. *Annual Review of Entomology*, 17: 103-122.
- Poinar, G. O. Jr.** 1975. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.
- Poinar, G. O. Jr.** 1979. Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, FL. CRC Press. 277pp.

- Poinar, G. O. Jr.** 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: Gaugler, R. & H. K. Kaya (Eds.). Entomopathogenic nematodes in biological (pp. 23-61). Boca Raton. FL, CRC Press.
- Pundt, L.** 1999. Fungus gnats are a serious pests. *YankeeGrower* (Sep-Oct): 9-10.  
<http://www.hort.uconn.edu/ipm/greenhs/htmls/fngnatser.htm>
- Quintana, F. A.** 1961. Plantas ornamentales (Floricultura) Flor de Nochebuena, Chapultepec, México, D. F.
- Rodríguez, Q. M., J. Valdéz C., J. Vera G. & A. Castillo.** 2000. Identificación de instares larvales de *Zabrotes subfasciatus* Boh (Coleoptera: Bruchidae) mediante las dimensiones de sus cápsulas cefálicas. *Agrociencia*,34: 83-90.
- Sánchez, S. O.** 1979. Flora del Valle de México. Ed. Herrero. México, D. F, pp. 230-240.
- Schlesinger, M. J.** 1990. Heat shock protein. *Journal Biology Chemical*, 265: 12111-12114.
- Schmidt, J. & J. N. All.** 1979. Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. *Environmental Entomology*, 8: 55-61.
- Selvan, S., P. S. Grewal, R. Gaugler & M. Tomalak.** 1994. Evaluation of steinernematid nematodes against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae; Species, strains, and rinse after application. *Journal of Economic Entomology*, 87: 605-609.
- Selvan, S., P. S. Grewal, T. Leustek & R. Gaugler.** 1996. Heat shock enhances thermotolerance of infective juvenile insect-parasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabtida: Heterorhabditidae). *Experientia*, 52: 727-730.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP** 2011.  
<http://www.siap.gob.mx/>.

- Shapiro, D. I., I. Glazer & D. Segal.** 1996. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. *Biological Control*, 6: 238-244.
- Shapiro, D. I., C. W. McCoy, A. Fares, T. Obreza & H. Dou.** 2000. Effects of Soil Type on Virulence and Persistence of Entomopathogenic Nematodes in Relation to Control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*. 29(5): 1083-1087.
- Shetlar, D. J., P. E. Suleman & R. Georgis.** 1998. Irrigation and use of entomogenous nematodes, *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditida), for control of Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 81: 1318-1322.
- Smits, P. H. & R. Ehlers.** 1991. Identification of *Heterorhabditis* spp. by morphometric characters and RFLP and of their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. by species specific DNA probes. Bulletin SRO/WPRS, 14(7): 195-201.
- Smits, P.** 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 379–387.
- Steffan W. A.** 1981. Sciaridae, pp. 247-255. In: J. F. McAlpine, B. V. Peterson, G. E. Shewell, H. J. Teskey, J. R. Vockeroth, and D. M. Wood (eds.). *Manual of Nearctic Diptera*, vol. 1. Research Branch Agriculture Canada Monograph 27: 1–674.
- Stevens R. S.; A. S. Downing & J. C. Pershing.** 1992. Comparison of Assays for the Determination of Entomogenous Nematode Infectivity. *Journal of Nematology*, 24(2): 271-274.
- Susurluk A.I. & R. U. Ehlers.** 2008. Comparison of some characterizations of recovery from soil and newly fermented Entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae; Heterorhabditidae). *Journal of Environmental Biology*, 2(6): 65-71.

- Tachibana, M., H. Hoki, N. Suzuki, T. Uechi, D. Kobayashi, H. Iwahana & H. K. Kaya.** 1996. Larvicidal activity of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus japonicus* from the entomopathogenic nematodes *Steinernema kushidai* *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 152-159.
- Veeranna R. & O. K. Remadevi.** 2010. Morphometry and biology of larval instars of *Alceterogystia cadambae*, heartwood borer of teakin India. *Journal of Tropical Forest Science*, 23: 434–439.
- Wallace, H. R.** 1958. Movement of elworms. *Annals of Applied Biology*, 46: 74–85.
- Wallace, H. R.** 1971. Abiotic influences in the soil environment. *In*: Zuckerman, W. F. & R. A. Rhode (eds). *Plant Parasitic Nematodes Vol. I* (pp 257-280). New York: Academic Press.
- Wharton, D. A.** 1986. *A Functional biology of nematodes*. London: Croom Helm.
- White, G. F.** 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. *Science*, 66: 302-303.
- Womersley, C. Z.** 1990. Dehydration and anhydrobiotic potential. *In*: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 117-137). Boca Raton. FL.; CRC. Press.
- Wood, M.** 1989. *Soil Biology*. New York: Chapman & Hall. pp. 154.
- Woodring, J. L. & H. K. Kaya.** 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Coop. Series Bulletin 331, 30 pp.