

MEJORAMIENTO DE LA TOLERANCIA AL CALOR Y LA DESECACIÓN DE TRES NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS.

RUIZ VEGA, J, SILVA RIVERA, M. E., MATADAMAS O., P. T. Y PEREZ PACHECO, R.

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR Unidad Oaxaca, IPN)
Calle Hornos 1003. Santa Cruz Xoxocotlán. C. P. 71230. Oaxaca. México
jvega@ipn.mx

Introducción

Los nemátodos entomopatógenos (NE) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos obligados en la naturaleza, ya que requieren de un hospedero adecuado para completar su ciclo. Para matarlo utilizan bacterias que coexisten en simbiosis. El tercer estadio emerge del cadáver de hospedero y puede permanecer por meses en el suelo hasta que encuentra un nuevo hospedero (Kaya y Koppenhofer, 1996).

Para que los nemátodos entomopatógenos logren matar a las larvas de las plagas del suelo, primero deben penetrar a través del integumento para llegar al homocelo. Los insectos resisten la infección de los nemátodos entomopatógenos por medio de estrategias de comportamiento, barreras físicas o adaptaciones fisiológicas (Tanada y Kaya, 1993).

Dentro de las estrategias de comportamiento el insecto evade o repele activamente a los nemátodos. Las larvas de mosquitos más activos tienen menos probabilidades de ser atacados por *Reesimermis neilseni* (Petersen, 1975), mientras que las larvas de escarabeidos pueden "limpiar" de su boca los nemátodos antes de que entren (Akhurst, 1986). Algunas barreras físicas incluyen el integumento, el cual se endurece con la edad de la larva; placas criba bloqueando los espiráculos y el tamaño de los nemátodos con relación al orificio de entrada (Gaugler y Molloy, 1981). Por medio de mecanismos fisiológicos, la larva puede destruir al nemátodo invasor con enzimas digestoras o por encapsulación melanótica (Nappi y Christiansen, 1987; Jackson y Brooks, 1989).

La mayor parte de los animales y plantas útiles han sido modificados por selección artificial y los mismos procesos han sido aplicados a los nemátodos entomopatógenos con cierto éxito (Tomalak, 1994; Grewal et al., 1996; Glazer et al., 1997).

El éxito al utilizar NE para controlar plagas depende de una serie de factores, incluyendo compatibilidad con la plaga y el ambiente, alta virulencia, persistencia y capacidad de búsqueda. La reproducción de los NE en laboratorio puede afectar dichos atributos debido a procesos que incluyen erosión genética, endogamia o selección involuntaria. Una alternativa para prevenir el deterioro de dichos atributos es la formación de líneas genéticamente uniformes (Gaugler, 2004).

De acuerdo a Segal y Glazer (2000), la genética es una herramienta poderosa para incrementar los atributos benéficos de los NE. Los métodos de mejoramiento incluyen: selección por tolerancia a estreses, cribado de aislados naturales para resistencia a calor, hibridación y mutagénesis, para lo cual la ingeniería genética es la mejor alternativa.

Sin embargo, Burnell y Dowds (1996) han opinado que antes de intentar la generación de nemátodos transgénicos, se debe entender mejor la genética y bioquímica de las características que podrían ser alteradas por la transferencia de genes, así como sus efectos sobre las bacterias simbiotas. Muchos de los atributos fisiológicos y de comportamiento, objetivo del mejoramiento, seguramente están controlados poligenéticamente, por lo que el mejoramiento selectivo sería más adecuado.

El uso extensivo de los nemátodos entomopatógenos está limitado por su susceptibilidad a factores como la desecación, siendo una de las formulaciones más efectivas la que incluye a los nemátodos en latencia con minerales arcillosos. Si los nemátodos fueran más tolerantes a la desecación, podrían prolongar su viabilidad por más tiempo (Strauch et al., 2004).

Justificación

La baja tolerancia de los nemátodos entomopatógenos a temperaturas mayores de 30 °C y a contenidos de agua menores a una a_w de 0.85 impide su utilización a nivel comercial y reduce su efectividad para el control de plagas en condiciones de campo.

Hipótesis

1. La exposición del nemátodo a valores de actividad del agua (a_w) menores a 1.0 permitirá seleccionar individuos con mayor tolerancia a la desecación.
2. La exposición del nemátodo a temperaturas altas permitirá identificar individuos con mayores posibilidades de sobrevivir en ambientes cálidos.
3. La cruce de individuos tolerantes a la desecación y tolerantes a la desecación producirá nemátodos con mayor vida de anaquel y efectividad para el control de plagas del suelo en condiciones semicontroladas.
4. La formulación y procesamiento mecánico adecuados de los nemátodos, mejora su tolerancia a la desecación, aumentando su viabilidad.

Objetivos

1. Generar una línea de nemátodos entomopatógenos resistente a la desecación
2. Generar una línea de nemátodos entomopatógenos resistente al calor
3. Producir un híbrido resistente al calor ya la desecación.
4. Incrementar la viabilidad de los nemátodos en formulación de pellets o utilizando cadáveres de galería como vehículos portadores.

Producto final (descripción)

Un bioinsecticida a base de nemátodos entomopatógenos con mayor efectividad para el control de plagas del suelo en condiciones de alta temperatura y/o baja humedad.

Materiales y métodos

META 1: Generar una línea de nemátodos entomopatógenos resistente a la desecación y altas temperaturas.

Se utilizarán 3 especies de nemátodos: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae*. Los infectivos juveniles serán sometidos a diferentes niveles de desecación y temperatura.

Los niveles de desecación se obtendrán aplicando distintas concentraciones de poliethylen glicol (PEG 600) para bajar la a_w de la suspensión de nemátodos a 0.95, 0.90 y 0.85, manteniéndola por 50 horas al cabo de las cuales se evaluará el porcentaje de sobrevivencia y capacidad de infección de los nemátodos. La capacidad de infección se evaluará empleando larvas de *Galleria mellonella* de tercer estadio, previamente tratadas para evitar su pupación. La progenie producida será sometida a los mismos tratamientos de desecación por 6 ocasiones más, con lo cual se obtendría una línea de nemátodos tolerantes a la desecación.

Los niveles de tolerancia a calor se aplicarían exponiendo a los nemátodos a temperaturas de 25, 30 y 35 °C por un período de 50 horas, al cabo del cual se evaluaría el porcentaje de sobrevivencia y capacidad de infección de los nemátodos por un procedimiento semejante al ya descrito anteriormente. En este caso, al cabo de 6 ciclos, se obtendría una línea de nemátodos tolerante a temperaturas altas.

META 2: Producir un híbrido resistente al calor ya la desecación.

Para la producción de un híbrido de ambas líneas, se utilizarán larvas de *G. mellonella* a las cuales se les inyectará la bacteria específica de la especie de nemátodo y posteriormente se inoculará cada una con 25 IJ's resistentes al calor y 25 resistentes a la desecación. La progenie obtenida se someterá a pruebas de sobrevivencia a distintas combinaciones de temperatura y a_w en laboratorio y a pruebas de efectividad de control de larvas de *Phyllophaga* sp. en campo utilizando formulados a base de bentonita y también cadáveres de galleria como vehículos portadores de los infectivos juveniles mejorados y sin mejorar.

En el experimento de campo, a realizarse en el segundo año, se establecerán plantas de maíz en bolsas de 15 litros de capacidad llenas con suelo esterilizado a las cuales se les adicionarán 5 larvas de *Phyllophaga* sp. en la etapa V5 del maíz. Una semana después, se aplicarán los nemátodos "mejorados" y "normales" en formulación de pellets a base de bentonita y utilizando los caváveres de galeria como portadores, evaluando 3 semanas después los porcentajes de control logrados.

Se tendrán 18 tratamientos, resultantes de la combinación de las tres especies de nemátodos x 2 niveles de mejoramiento x 3 formulaciones, en un diseño completamente al azar con 6 repeticiones. Los resultados se analizarán por medio del paquete estadístico SAS, utilizando la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad para la separación de medias.

En un experimento independiente, se evaluará el % de sobrevivencia de las distintas formulaciones almacenado a temperatura ambiente por 1, 2 y 3 meses,

META 3. Incremento de la eficacia de control por medio de distintas formulaciones

Se contemplan dos submetas, ambas relacionadas con formulación de nemátodos.

3.1 Evaluación de tres nemátodos en distintas formulaciones y porcentaje de agua en el suelo

Utilizando vasos plásticos de 200 ml llenos con 200 g de suelo estéril con dos niveles de humedad, se evaluará la capacidad de control de tres nemátodos entomopatógenos sobre larvas de tercer estadio de *Phyllophaga vetula*.

Los nemátodos a utilizar serán *Steinernema feltiae* var. Oaxaca, *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora*. Una semana después de depositadas las larvas en cada vaso, se adicionarán los nemátodos sin formular, formulados en pellets de bentonita ó formulados en cadáveres de galleria. Las dosis aplicadas, así como otros tratamientos adicionales, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos experimentales evaluados en condiciones de laboratorio. 2005.

Tratamiento	Nemátodo	Formulación	Humedad
1	<i>S. feltiae</i>	Pellet	Moderada
2	<i>S. glaseri</i>	Pellet	Moderada
3	<i>H. bacteriophora</i>	Pellet	Moderada
4	<i>S. feltiae</i>	Pellet	Alta
5	<i>S. glaseri</i>	Pellet	Alta
6	<i>H. bacteriophora</i>	Pellet	Alta
7	<i>S. feltiae</i>	Cadáver	Moderada
8	<i>S. glaseri</i>	Cadáver	Moderada
9	<i>H. bacteriophora</i>	Cadáver	Moderada
10	<i>S. feltiae</i>	Cadáver	Alta
11	<i>S. glaseri</i>	Cadáver	Alta
12	<i>H. bacteriophora</i>	Cadáver	Alta
13	<i>S. feltiae</i>	Sin formular	Moderada
14	<i>S. glaseri</i>	Sin formular	Moderada
15	<i>H. bacteriophora</i>	Sin formular	Moderada
16	<i>S. feltiae</i>	Sin formular	Alta
17	<i>S. glaseri</i>	Sin formular	Alta
18	<i>H. bacteriophora</i>	Sin formular	Alta
19	0	0	Moderada
20	0	0	Alta

La unidad experimental estuvo constituida por 10 vasos, a los cuales se les aplicó agua periódicamente para mantener la humedad dentro de un rango del 20-25 % de la planeada. La humedad alta equivale a un contenido de humedad del 20.5 % (.0.8 MPa), mientras que la moderada a 11.8 % (0.6 Mpa) en un suelo de textura de migajón arenoso. Así, para mantener al suelo con humedad alta, se le aplicaron inicialmente 41 g de agua por vaso, reponiendo 10 g de agua cuando esta cantidad se perdía según el pesado periódico realizado en una balanza electrónica.

Se establecieron cuatro repeticiones por tratamiento en un diseño experimental completamente al azar. Cada semana se registró el número de larvas vivas, vaciando totalmente el contenido del vaso para una mejor revisión.

3.2 Determinación de la mejor combinación de variables de operación para la elaboración mecánica de pellets con nemátodos entomopatógenos.

Se utilizará una máquina encapsuladora cuyo principio de funcionamiento es el flujo de material granular a través de un cono de alojamiento de nematodos en suspensión. La compactación de los pellets en formación se lleva a cabo en un transportador tipo sinfín y, posteriormente, en un disco giratorio. Las variables de operación de este proceso son: V : velocidad lineal del flujo granular, v : velocidad lineal de transporte en el sinfín y ω : velocidad angular del disco compactador. Sus niveles se obtendrán mediante ajustes a la máquina y serán: V : 3, 2, 1 cm/s; v : 12, 8, 4 cm/s y ω : 60, 50, 40 rpm.

Los experimentos se realizarán probando cada nivel con tres repeticiones. Se producirán 100 pellets para cada repetición, teniendo un total de 2 700 pellets. Los pellets serán caracterizados por su coeficiente de esfericidad, peso y coeficiente de homogeneidad según el método propuesto por Espinosa (2005). Solo los pellets con un coeficiente de homogeneidad mayor a 0.95 pasarán a las pruebas de viabilidad y capacidad de infección de los nematodos.

El mejor proceso será el que produzca mayor cantidad de pellets homogéneos, con mayor porcentaje de sobrevivencia y mayor capacidad de infección.

Productos esperados

- Titulación de un tesista a nivel maestría
- Una residencia profesional
- Asistencia a dos congresos científicos
- Elaboración de dos artículos científicos
- Una entrevista en radio y/o tres nemátodos entomopatógenos televisión local.

Participantes y actividades

Dr. Rafael Pérez Pacheco; hibridización de nemátodos, análisis de datos
M. C. Teodulfo Aquino Bolaños; reproducción de galerías, apoyo en campo
M. C. María Eugenia Silva Rivera; hibridización de nemátodos
Dr. Pastor Matadamas Ortiz; Formulación de nemátodos en máquina peletizadora.

Colaboración interinstitucional

El Dr. Harry K. Kaya de la Universidad de California, Davis (hkkaya@ucdavis.edu) será el asesor técnico del proyecto.

RESULTADOS

1. Incremento de la resistencia a calor y sequía.

Los bioensayos preliminares realizados en el Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR Unidad Oaxaca durante junio y julio del 2005. indicaron que a medida que la *Aw* fue menor, la sobrevivencia de todos los nemátodos disminuyó, siendo aparentemente *S. glaseri* el más tolerante a la desecación, seguido por *S. riobravis* (Cuadro 2). En cuanto a tolerancia a altas temperaturas, también se observó una tendencia similar en la disminución del % de sobrevivencia (Cuadro 3), siendo *S. riobravis* el más tolerante a altas temperaturas. Shapiro-Llan *et al.* (2005) detectaron a este nemátodo como el más tolerante a calor y a deficiencias de oxígeno. Los menos tolerantes fueron *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae*. Este último solo ha resistido seis h a 35 °C (Cheng y Hou, 1997).

Se continuará con el proceso de selección de individuos resistentes para eventualmente producir un nemátodo con características de resistencia a sequía y/o calor.

Cuadro 2. Sobrevivencia de tres nemátodos entomopatógenos a distintas condiciones de disponibilidad de agua. 2005.

Tratamiento	Aw	Nemátodo	Sobrevivencia %
1	1.0	S. carpocapsae	87.0
2	0.9	S. carpocapsae	33.5
3	0.7	S. carpocapsae	36.7
4	0.5	S. carpocapsae	16.2
5	0.3	S. carpocapsae	6.6
6	1.0	S. glaseri	87.0
7	0.9	S. glaseri	76.6
8	0.7	S. glaseri	68.2
9	0.5	S. glaseri	24.4
10	0.3	S. glaseri	4.4
11	1.0	S. riobravis	61.9
12	0.9	S. riobravis	55.0
13	0.7	S. riobravis	38.8
14	0.5	S. riobravis	23.4
15	0.3	S. riobravis	6.5

Cuadro 3. Sobrevivencia de tres nemátodos entomopatógenos a distintas temperaturas. 2005.

Tratamiento	Temperatura °C	Nemátodo	Sobrevivencia %
1	25	Sc	61
2	25	Sr	50.3
3	25	Hb	61.3
4	30	Sc	41
5	30	Sr	36.2
6	30	Hb	51.65
7	35	Sc	10.55
8	35	Sr	13.3
9	35	Hb	0

2. Evaluación de formulaciones

El nemátodo más sobresaliente fue *S. glasieri*, ya que sin formular y aplicado en condiciones de humedad moderada logró un 75 % de control a los 35 días de aplicado (Cuadro 4). Sin embargo, no difirió estadísticamente del % de control logrado aplicando cadáveres conteniendo al nemátodo, lo cual implica que estos últimos son una "formulación" adecuada para esta especie de nemátodos.

Cuadro 4. Porcentaje de control de larvas de *Phyllophaga vetula* con nemátodos entomopatógenos aplicados en distintas formulaciones y humedad del suelo. 2005.

Tratamiento	Nemátodo	Formulación	Humedad del suelo	Control (%)
14	<i>S. glasieri</i>	0	Moderada	75.0 a*
8	<i>S. glasieri</i>	Cadáver	Moderada	55.0 a
17	<i>S. glasieri</i>	0	Alta	30.0 b
12	<i>H. bacteriophora</i>	Cadáver	Alta	22.5 bc
19	0	0	Moderada	15.0 cbd
20	0	0	Alta	10.0 cbd

* Prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

Meta 3.1. Determinación de la mejor combinación de variables de operación para la elaboración mecánica de pellets con nemátodos entomopatógenos

Responsable: Dr. Pastor Teodoro Matadamas

2.1 Conos de cobertura

Se realizaron pruebas de funcionamiento del sistema de cobertura del prototipo de peletizador. El sistema de cobertura consta de una serie de conos truncados dispuestos en forma proporcional a lo largo de la circunferencia de un disco, cuya función es dar movimiento radial al proceso de cobertura.

El principio de esta máquina se basa en que a través de una corriente concéntrica, se cubra una gota de solución, dicha corriente es generada a través de un cono truncado invertido, el cono es llenado por la parte superior que es el acceso de mayor diámetro y se mantiene tapada la salida, que es el orificio de menor diámetro, al liberarla genera una corriente en el centro del cono, creando una caída de material de las paredes del cono, siendo éste aprovechado para cubrir una gota que se depositará en su parte superior; al ser expuesta la gota a dicha corriente quedara cubierta por material generando así una cápsula semiesférica.

2.2.- Disco de conos de cobertura

Hasta este punto la maquina peletizadora ha logrado cumplir con su objetivo, pero aun no esta totalmente terminada porque el proceso de elaboración no está totalmente automatizado. Para lograr lo anterior es necesario proponer un concepto que es generar una

serie de conos dispuestos en un plato giratorio entorno a un eje fijo, con lo cual se obtendría una producción continua y cíclica.

No obstante no debemos olvidar que el material con el cual estamos trabajando es bentonita la cual es de tamaño granular poco superior a las 2 μm o más pequeño, es un dato importante pues es un factor que puede evitar su flujo en un dado caso si se encuentra muy compactado.

Esto nos introduce las primeras variables a considerar así como las constantes y limitaciones que se poseerán en la máquina, es decir no podemos permitirnos un tiempo muy prolongado en la conformación de un pellet ya que hay una producción que alcanzar que es de 1000 pellets por hora es decir debemos ajustar lo más posible estos tiempos; posteriormente tenemos la limitante de 200 μl los cuales son los apropiados por su concentración de nemátodos por porción, la altura debe ajustarse ala conveniencia de la conformación de la cápsula, así como la velocidad de avance del mismo.

Es importante determinar estas variables pues ellas nos darán en este caso para el mecanismo de dosificación la altura a la que debe estar situado y la frecuencia con que debe dosificar y en un punto más lejano la velocidad a para efectuar la dosificación.

Variables a considerar

1. Tiempo de inyección
2. Tiempo de vibrado
3. Tiempo de descarga
4. Tiempo de compactación
5. Tiempo total del experimento
6. Volumen inyectado
7. Altura de inyección
8. Altura de descarga
9. Profundidad de marca

Objetivo a alcanzar

Producción de 1000 cápsulas por hora

Objetivo parcial

Producción de 600 cápsulas por hora

Los experimentos fueron realizados por el estudiante en residencia profesional C. Pascual Gabriel Alejandro, con la asesoría del Dr. Pastor Matadazas Ortiz, participante del proyecto. Los resultados se discuten a continuación.

Nomenclatura de las tablas

No = Número del experimento y cajón de muestras

TI = Tiempo de inyección

TV = Tiempo de vibración

TD = Tiempo de descarga
TS = Tiempo en el sinfín
V = Volumen
AI = Altura de inyección
AT = Altura de caída de la tolva al sinfín
H = Profundidad de marca
X, Y, Z = Ejes a medir en la cápsula
%= Coeficiente de esfericidad
TT = Tiempo total del experimento

La viabilidad la definimos en función de que las cápsulas se encuentren completamente selladas, esto es que los nemátodos se encuentren en perfecto aislamiento, pues nuestro objetivo principal es lograr la supervivencia de la mayor cantidad de los microorganismos en su interior.

El color indicado en las celdas indican cuantas de las cápsulas se encontraron totalmente selladas después de el periodo de desecación al aire ambiente, aunque los procesos de conservación para los nemátodos sea el mantenerlos siempre hidratados mediante la permanecía en una recamara fría.

Posteriormente tenemos la esfericidad en combinación del hermetismo y esto lo indicamos en un porcentaje en la última columna, en los futuros experimentos no solo se necesitara que las cápsulas se encuentren totalmente selladas sino que también se encuentren con una esfericidad adecuada.

El criterio exigido por el diseñador es de un 85% de esfericidad pero nosotros como nueva meta tenemos por alcanzar un 90% de esfericidad esto no quiere decir que si se alcanza un 100% de esfericidad estemos tratando con esferas completamente, no, solo quiere decir que es un cuerpo cercano a la forma esférica admisible para cuestiones de experimentación.

Además cabe mencionar que los criterios de esfericidad son tomados en cápsulas con humanad y que esta forma llega a cambiar al igual que su tamaño, al momento de desecados.

De los resultados obtenidos en la fase experimental podemos determinar que el 51.72% de las cápsulas formadas resultaron ser viables después del periodo de desecación es decir que conservaron su hermeticidad aun después del desecado.

El 27% de las cápsulas no solo resultaron ser viables sino que también resultaron con una forma esférica superior al 90%.

Los anteriores resultados nos darán la pauta de que es lo que debemos variar y que es lo que debemos conservar de los experimentos realizados tanto en la etapa del desecado como de la esfericidad esperada así pues compararemos los mejores resultados en busca de la solución a nuestros dos primeros objetivos y definiremos nuestras variables y nuestras constantes.

Eliminado los resultados que no son favorables para nuestro objetivo a seguir, así como las constantes que se han manejado hasta el momento, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 2.3 Depuración de resultados de exploración

No	T.D	T.S	%
7	11	35	87
10	46	28	91
11	50	36	91
12	90	32	91
13	22	34	86
14	26	30	97
15	20	26	91
16	20	25	94
17	16	28	88
18	11	25	93
19	14	26	91
20	14	26	86
21	11	26	94
23	11	30	97
24	12	27	90
25	11	26	96
26	13	27	88
27	55	30	86
29	17	23	93

De este modo solo tenemos dos variables que son el tiempo de desalojo y el tiempo en el sinfín y si eliminamos los datos en los cuales no se han obtenido resultados favorables obtenemos los resultados mostrados en la siguiente.

Tabla 2.4 Datos de alto porcentaje de esfericidad y viabilidad de las cápsulas.

No	T.D	T.S	%
14	26	30	97
16	20	25	94
21	11	26	94
23	11	30	97
25	11	26	96

Por lo tanto tenemos que los mejores resultados los encontramos al tener un tiempo cercano a los 10 segundos para desalojar los conos y un tiempo entre 25 y 30 segundos en el sinfín.

Estos datos serán importantes para las pruebas con nematodos en los cuales será importante tanto esfericidad como hermetismo en las cápsulas.

Ahora basados en la observación nos hemos percatado de la existencia de varia zonas de vibración en el disco de dosificación dividiendo así el mismo en diferentes regiones y dando lugar a una nueva duda que es la siguiente: la vibración es benéfica o perjudicial para la conformación de las cápsulas.

Y para despejar la misma fue necesario la experimentación en presencia de vibración y sin la misma dando los siguientes resultados:

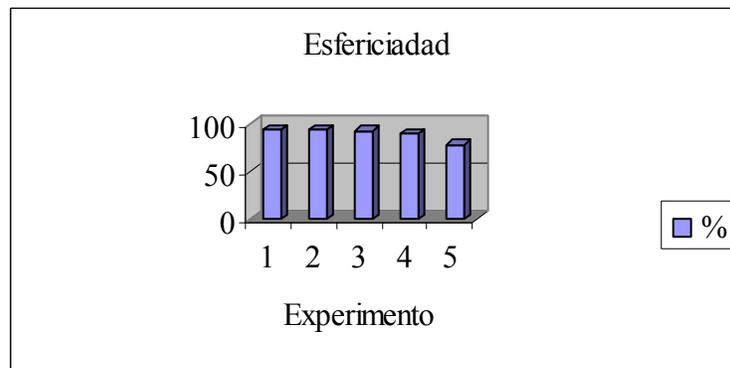
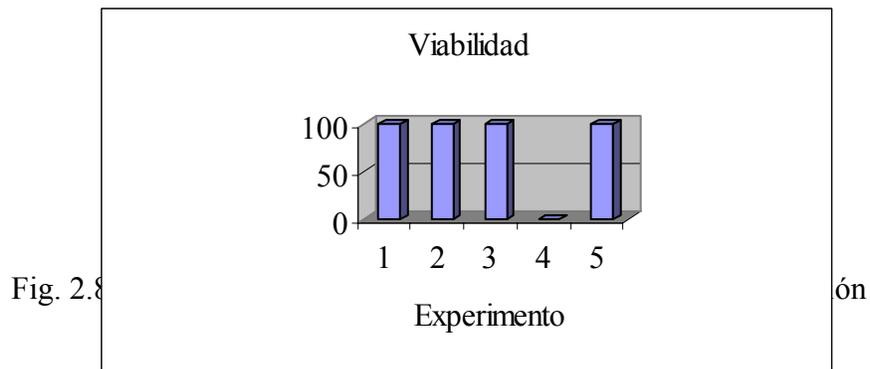


Fig. 2.9 Grafica de esfericidad en zona de alta vibración.

Conclusiones

La vibración no afectó en forma importante la viabilidad de las cápsulas. No obstante, también fue apreciable que la esfericidad no fue muy buena cuando no se utilizó vibración, es decir, la esfericidad estuvo en función de la vibración recibida por los conos.

La continuación de los experimentos dará por resultados definir el rango óptimo de funcionamiento del prototipo.

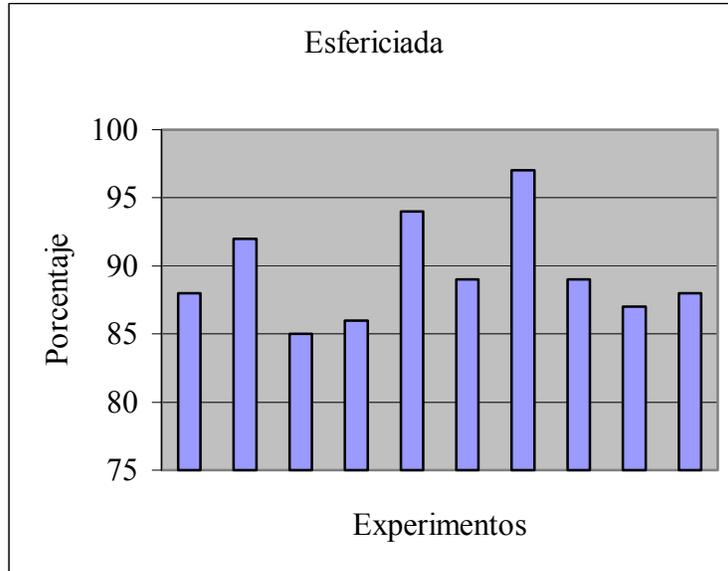


Fig. 2.10 Grafica de esfericidad en zona de baja vibración.

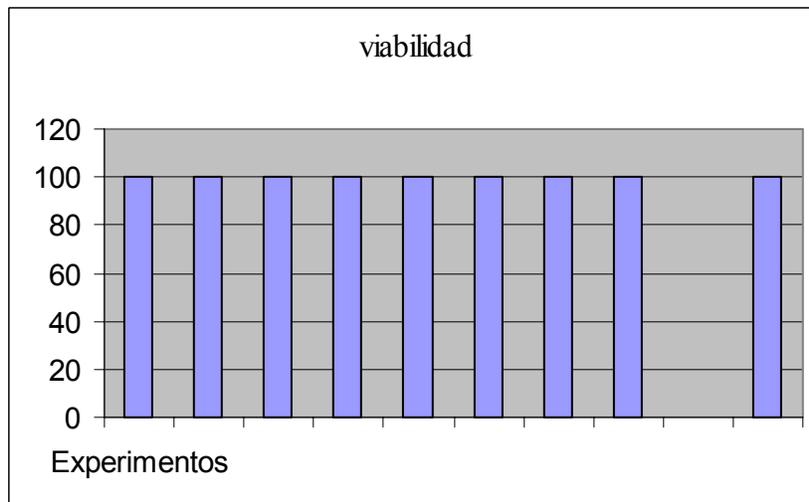


Fig. 2.11 Grafica de viabilidad en zona de baja vibración.

Conclusiones (continuación)

Existen especies de nemátodos mas tolerantes al calor y a la desecación, pero cada especie podría tener un rango óptimo de temperatura-humedad para mayor sobrevivencia.

La formulación en cadáveres fue tan eficiente como la utilización del nemátodo sin formular.

El nemátodo mas eficaz para el control de *Phyllophaga vetula* fue *S. glaseri*.

REFERENCIAS

- Akhurst, R. J. 1986. Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes. *In* R. A. Samson, J. M. Vlak and D. Peters, eds. Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. pp. 265-267. Fourth Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Wageningen, The Netherlands.
- Burnell A. M. y B. C. A Dowds. 1996. The genetic improvement of entomopathogenic nematodes and their symbiont bacteria: phenotypic targets, genetic limitations and an assessment of possible hazards. *Biocontrol Sci. Technol.* 6(3): 435-447.
- Gaugler, R.
- Cheng, Chi-Chin and R. F. Hou. 1997. Effects of environmental factors on survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Chinese J. Entomol.* 17:120-131.
- Espinoza R. M. 2005. Tesis: Diseño de una máquina encapsuladora de nematodos entomopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Mecánica Agrícola. CHAPINGO, México. 120 p.
- Gaugler, R. y Molloy, D. 1981. Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nemátode *Neoplectana carpocapsae*. *J. Nematol.* 13: 1-5.
- Glazer I., L. Salame, and D. Segal (1997). Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 7 (4):499-512.
- Grewal, P. S., R. Gaugler, and Y. Wang (1996). Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. *Annals of Applied Biology* 129 (2):335-341
- Jackson, J. J. y M. A. Brooks, 1989. Susceptibility and immune response of western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1073-1077.
- Kaya, H. K. y A. M. Koppenhofer. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. and Technol.* 6: 357-371.
- Nappi, A. J. y B. M. Christiansen, 1987. Insect immunity and mechanisms of resistance by nematodes. *In* J. A. Veech y D. W. Dickson, eds. *Vistas on Nematology*, pp. 285-291. E. O. Painter Printing Co., DeLeon Springs, Florida.
- Petersen, J. J. 1975. Penetration and development of the mermithid nematode *Reesimermis neilseni* in eighteen species of mosquitoes. *J. Nematol.* 7: 207-210.
- Shapiro-Llan, D. I., R. J. Stuart and C. W. McCoy. 2005. Characterization of biological control traits in the entomopathogenic nematode *H. mexicana* (MX4 strain). *Biol. Control.* 32: 97-103.

Segal D. y I. Glazer. 2000. Genetics for improving biological control agents: The case of entomopathogenic nematodes. *Crop Protection* 19(8-10): 685-689.

Strauch , O., J. Oestergaard, S. Hollmer y R. U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biological Control* 31(2): 218-226.

Tanada Y. y H. K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press Inc. San Diego, Ca., USA. 666 p.

Tomalak, M. (1994). Genetic improvement of *Steinernema feltiae* for integrated control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Bulletin OILB/SROP* 17(3), 17-20.