

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Centro de Investigaciones Agropecuarias

***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) como
alternativa para la reproducción del
nematodo entomopatógeno
(*Heterorhabditis indica* Poinar Cepa P₂M)**



Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo

Autora: Lauren Leanne Sandi St. Louis

**Tutores: Dr. C. Edilberto Pozo Velázquez
M. Sc. Roberto Valdés Herrera**

Año 2010

“Año 52 de la Revolución”

Pensamiento

Es preferible no ser, al no ser sincero.

José Martí

Dedicatoria

A mi abuela, Muzzy, quien me alentó para alcanzar mis metas profesionales, quien me enseñó la vida, quien me hizo entender la razón de la existencia y quien hasta ahora sigue rezando por mi.

A mi Poppy, especial e inigualable por su ejemplo de fortaleza, disciplina y valores. Gracias por tu inmenso amor.

A mi mama, quien me ha ayudado y apoyado a lo largo de la vida y que me ha hecho posible que mis sueños se hagan realidad, por ser quien colma todas mis expectativas, y por ser fuente y motivación de mi sacrificio.

A mis hermanas, Sheri, Rhea y Danya, quienes con su comprensión y amor han transformado mi persona, haciendo que día tras día esté en busca del camino del éxito.

Gracias, mi familia, por ser mi punto de apoyo, y por darme el impulso y la seguridad para alcanzar esta meta.

Gracias por este amor que me dieron, que fue la fuerza que me estimuló y me dio fuerzas para seguir adelante.

Te quiero tanto.....

Lauren

To my Grandmother, Muzzy, who has taught me to reach for my goals, and has taught me about life, who has made me understand my reason for being, and who, even now, is still praying for me.

To my Poppy, special and exceptional, for your example of strength, discipline and values. Thank you for your immense love.

To my Mommy, who has helped and supported me throughout my life and who has made it possible for me to realize my dreams, for being the one to satisfy my expectations and for being the source and motivation of my sacrifices.

To my sissies, Sheri, Rhea and Danya, whom with your understanding and love have formed me as a person, ensuring that day after day I seek the path of success.

Heartfelt thanks to my family for being my support, and for giving me the drive and security necessary for me to reach this goal.

For all the love you all have shown to me, which has been my driving force and which has given me the strength to keep keeping on, thank you.

Love you so much.....

Lauren

Agradecimientos

De corazón, a todas las personas que me han brindado el apoyo y la ayuda necesaria en toda mi carrera, muchas gracias.

A Dios por su esfuerzo y la ayuda que me brindó en todos mis momentos, difíciles y buenos.

A mi familia, quienes me han apoyado en todo momento.

A Rodrique por siempre estar con brazos abiertos y orejas dispuestas.

A Poochie por ser mi verdadera amiga.

A "mis muchachos", Brian, Vivian y Denton, desde la preparatoria hasta aquí y más allá, por todo. Seremos amigos para siempre.

A mi tutor, Dr. C. Edilberto Pozo Velázquez, por su ayuda y las horas de tiempo dedicado a la culminación de este trabajo.

A Marlen por su infinita ayuda.

A Mercedes quien siempre me ayudaba y me brindaba su sabiduría.

A todos mis profesores por enseñarme y hacer de mí lo que hoy soy, porque han enriquecido mi conocimiento y se han consagrado a mi superación profesional.

A la amistad Cubana-Granadiense por proveer esta oportunidad de estudiar y hacer mejor mi vida.

A todos y cada uno, quien me llama amiga, por su ayuda en una manera u otra, por hoy y por siempre.....

Muchas Gracias!!!

Resumen

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), ubicado en la Universidad Central de Las Villas (UCLV), entre los meses de marzo del 2010 a Junio del 2010. En la realización del mismo se colectaron insectos de la especie *Spodoptera frugiperda* (J.

E. Smith.) (Lepidoptera; Noctuidae), en el estado larval, provenientes de campos de maíz (*Zea mays*) y se procedió a una cría sucesiva de esta especie según la metodología de Armas y Ayala (1990) y Gómez *et al.* (1994) para obtener individuos libres de enfermedades y parasitoides. Se evaluó la susceptibilidad, respuesta al aumento de dosis y la rapidez de acción del nematodo entomopatógeno (*Heterorhabditis indica*) de la cepa P₂M sobre las larvas. Se determinó el instar más susceptible y lo más productivo en la reproducción masiva de los nematodos. *Spodoptera frugiperda* resultó ser susceptible a los nematodos entomopatógenos siendo el segundo instar el más susceptible (100% de mortalidad a los 48 horas), seguido por el tercer. El quinto instar resultó más productivo con rendimientos de 85 850 n/l, seguido por el cuarto con 40 950 n/l. Se concluye que el lepidóptero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) puede ser utilizado como hospedante alternativo en la producción masiva de los nematodos entomopatógenos, a través de una crianza con dieta natural, *Sorghum halepense* Pers.

Índice

Pensamiento
Dedicatoria
Agradecimiento
Resumen

1	Introducción.....	1
2.	Revisión bibliográfica.....	3
2.1.	Nematodos entomopatógenos.....	3

2.1.1. Aspectos generales de los nematodos entomopatógenos.....	3
2.1.2. Ciclo de vida y Ecobiología.....	5
2.1.3. Búsqueda y Penetración.....	6
2.1.4. Proceso de infección.....	6
2.1.5. Mecanismo de supervivencia.....	6
2.1.6. Asociación Mutualista Nematodo- Bacteria.....	7
2.1.7. Rango de hospedantes.....	7
2.1.8. Efectividad y Estrategias de aplicación en plagas agrícolas.....	8
2.1.9. Reproducción Masiva <i>in vivo</i>	8
2.1.10. Producción de los nematodos entomopatógenos.....	9
2.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	10
2.2.1. Aspectos generales de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith).....	10
2.2.2. Características de <i>S. frugiperda</i>	10
2.2.3. Dieta Artificial de <i>S. frugiperda</i>	12
2.2.4. Crianza con dieta natural.....	13
3. Materiales y Métodos.....	15
3.1. Susceptibilidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (Lepidoptera; Noctuidae) al nematodos entomopatógeno <i>Heterorhabditis indica</i> Poinar cepa P ₂ M.....	15
3.2. Determinación del instar más susceptible.....	17
3.3. Empleo de varias concentraciones de <i>H. indica</i> P ₂ M contra el instar V de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith).....	18
3.4. Evaluación del instar más productivo en la reproducción de los Infestivos Juveniles (IJ ₃).....	18
3.5. Determinación de las correlaciones existentes en cuanto a morfología del cuerpo de <i>Spodoptera frugiperda</i> en comparación con <i>Galleria mellonella</i> L.....	19
3.6. Análisis estadísticos.....	19
4. Resultados y Discusión.....	20
4.1. Susceptibilidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (Lepidop- tera; Noctuidae) al nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i> <i>indica</i> Poinar cepa P ₂ M.....	20
4.2. Determinación del instar más susceptible.....	21
4.3. Empleo de varias concentraciones de <i>H. indica</i> P ₂ M contra el V instar <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith).....	22

4.4. Evaluación del instar más productivo en la reproducción de los Infestivos Juveniles (IJ ₃).....	24
4.5. Relación de las larvas de los últimos instares de <i>G. mellonella</i> y <i>S. frugiperda</i>	28
5. Conclusiones.....	30
6. Recomendaciones.....	41
7. Referencias Bibliográficas.....	42
8. Anexos.....	43

Introducción

El uso de insecticidas químicos sigue siendo el principal método para el control de insectos plagas; sin embargo, debido a los efectos colaterales negativos es necesario contar con alternativas para el control de los mismos. El control biológico es una alternativa viable, y dentro del mismo, el uso de nematodos entomopatógenos es un medio biológico que ha dado buenos resultados para ciertos insectos. (Mayoral *et al.*, 2008)

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* conviven en asociación simbiótica con bacterias en su interior de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente, han resultado ser una opción ambientalmente segura y eficientes controles biológicos de plagas insectiles, fundamentalmente de aquellos que habitan o pasan parte de su ciclo biológico en el suelo. (Begley, 1990; Klein, 1990).

Los juveniles infestivos (IJ₃) de estos nematodos poseen atributos tanto de parasitoides y depredadores de insectos como de patógenos microbiológicos. Coincidente con los primeros, los IJ₃ poseen quimiorreceptores, son móviles altamente virulentos; siendo capaces de provocarle rápidamente la muerte a los hospedantes y ser cultivados fácilmente *in vitro*. (Kaya y Gaugler, 1993).

Actualmente, los NEPs son usados de forma extensiva o inundativa, sin embargo, los reportes de ocurrencia natural, su potencial para el control a largo plazo y los medios de cultivo posibles de estabilizar su población; deben estimular investigaciones para conocer sus potenciales como antagonistas en sistemas sostenibles. (Pozo, 2003; Valdés, 2003).

Ruiz (2005) en su trabajo de diploma, expone que pueden ser empleados en organopónicos y campos medianos, aplicados por mochilas de aspersión. Además, evitan que las plantas sean dañadas por plagas durante un amplio período al ejercer control sobre más de 100 especies de insectos.

Los estudios sobre el empleo de diversos insectos-plagas en la producción de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de las plagas insectiles es muy importante. La utilización de insectos-plagas en la producción de nematodos es una alternativa a explotar porque nos brinda la posibilidad de producir estos organismos en varios lugares del país, logrando de esta forma una red de producción de los mismos. Así se puede obtener alternativas para la “producción rústica” de estos agentes de control biológicos tan efectivos en el combate de las plagas agrícolas insectiles.

En Cuba, sólo se reproducen NEPs a través del hospedante *Galleria mellonella* (L.) que lleva consigo altos costos de producción. Debido a estos costos, sería preferible buscar alternativas económicas, que se pueda utilizar como hospedante.

Por lo antes señalado nos proponemos la siguiente hipótesis:

- Si *Spodoptera frugiperda* fuera hospedante alternativo en la producción de nematodos entomopatógenos, entonces se obtendría este medio biológico masivamente y contribuiría a producirlos por esta vía en los Centros de Reproducción de Entomopatógenos.

Para darle cumplimiento a la hipótesis se estableció el siguiente objetivo general:

- Determinar si *Spodoptera frugiperda* puede ser un hospedante alternativo en la producción masiva de *Heterorhabditis indica* cepa P₂M.

De éste se derivan los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), ante de la cepa P₂M de nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis* spp.
2. Estudiar la susceptibilidad de diferentes instares larvales de *S. frugiperda* (J. E. Smith) ante nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica*.
3. Determinar la dosis de inoculación y el instar más efectivo para la producción de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis indica*).
4. Relacionar las larvas de los últimos instares de *G. mellonella* y *S. frugiperda*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Los Nemátodos Entomopatógenos

2.1.1 Aspectos generales de los nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos entomopatógenos se ubican en el Orden Rhabditida Suborden: Rhabditina Superfamilia Rhabditoidea, (Woodring and Kaya, 1988). Existen ocho familias de nemátodos reconocidas como parásitos de insectos, éstas son: Allantonematidae, Diplogasteridae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerularidae, Tetradonematidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae. La familia Steinernematidae comprende los géneros *Neosteinerinema* (Nguyen & Smart, 1994) y *Steinerinema*, (Travassos, 1927) citado por Marrero, 2003. La familia Heterorhabditidae tiene como único representante al género *Heterorhabditis*. (Poinar, 1990).

Alves (1986) señala las características más relevantes que han propiciado que los nemátodos sean atractivos como agentes biocontroladores:

- Resisten a otros químicos usados en la agricultura, por lo que pueden ser aprovechados en programas de control integrado.
- Poseen efecto sinérgico con otros agentes entomopatógenos, por lo que pueden aumentar la eficiencia y la economía del método.
- En muchos casos superan a otros entomopatógenos en los índices de mortalidad que provocan.
- Poseen buena capacidad de adaptación a nuevos ambientes y tienen la capacidad de moverse en el ambiente y buscar a su hospedante.
- No causan daños a las plantas ni a los mamíferos.
- Muchas veces se reproducen sin la presencia de los machos (hembras partenogénicas).

Algunas especies se encuentran asociadas a insectos, en relaciones que van desde fortuitas hasta parasíticas. Estas últimas, puede ocasionar diferentes efectos deletéreos sobre sus hospederos, que pueden ir desde reducción en la fecundidad, esterilidad y longevidad, disminución en la actividad, retraso en el desarrollo, cambios

fisiológicos, morfológicos y de comportamiento y hasta la muerte (Poinar, 1989).

Los nemátodos entomopatógenos son de reciente uso en la agricultura en comparación con otros métodos de control biológico (Georgis and Manwiler, 1994) y (Rosales *et al.*, 1998). Su utilidad práctica para el control de numerosos insectos plagas, la relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes (24 – 48 horas) y la alta variabilidad de su acción, los ha convertido en un baluarte de la protección fitosanitaria, principalmente como parte del Manejo Integrado de Plagas. (Arteaga *et al.*, 1994) y (Certis, 2003).

Estos nemátodos poseen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante Kaya and Gaugler (1993); Lewis *et al.* (1993) y Gaugler (2004). Algunas especies manifiestan el tipo de “espera pasiva” (ambusher) en la que los individuos permanecen cerca o en la superficie del suelo e infestan a los insectos móviles que se alimentan en la interfase del suelo y los que tienen una estrategia de “búsqueda activa” (cruiser) como ocurre en *H. bacteriophora* que tienden a ser muy móviles y responden a las emanaciones químicas de los hospedantes e infestan fundamentalmente a los insectos menos móviles. Esta atracción de los nemátodos a estímulos químicos es atribuida a menudo a la orientación klinotáctica.

Más de 100 especies de insectos pertenecientes a los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Isoptera, Thysanoptera, Homoptera y Hemiptera, entre otros han resultado ser hospedantes de los nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y campo. (Poinar, 1990; Doucet y Giayetto, 1994; Alatorre y Hernández, 2000)

A pesar de que se considera que prácticamente no existen especies de insectos que no sean susceptibles a los nemátodos entomopatógenos, lo cierto es que según (Grewal, 1996) las barreras de comportamiento provocan una reducción de la eficacia de los nemátodos para seleccionar pocos hospedantes o grupos de ellos, de ahí que una vez que son aplicados (al suelo o follaje) en condiciones de campo, las especies (aislamientos) se comporten de manera diferente.

Existen registrados más de 40 productos comerciales a base de nemátodos entomopatógenos (Lisansky, 1993), que en su gran mayoría utilizan steinernemátidos (ejemplo: biovector, Biosafe, Exhibit, Nemo) y en menor número heterorabditidos (ejemplos: Otinem, Nemasys).

2.1.2 Ciclo de Vida y Ecobiología.

Tanto la familia *Steinernematidae* como *Heterorhabditidae* tienen un ciclo de vida similar y simple que incluye el huevo, cuatro fases juveniles: J₁, J₂, J₃ y J₄ (separadas por mudas) y el adulto. La fase infestiva es el estado juvenil J₃, el cual posee la región cefálica con armadura, a manera de diente dorsolateral o subventral y tiene células vivas de su bacteria simbiote en el intestino, llevándola de hospedante a hospedante. Los infestivos juveniles (ijs) generalmente son envainados dentro de la cutícula del J₂ que no se desprendió de la misma al pasar al ij₃, pero está separado e intacto de esta segunda pared. Esta extracutícula le confiere una importancia en la resistencia a las condiciones medioambientales desfavorables, aunque la fisiología de estos le confiere resistencia, (Woodring and Kaya, 1988). Ellos pueden ser efectivamente producidos y almacenados por largos periodos (Sánchez, 2003).

Los infestivos juveniles son los únicos de vida libre fuera del hospedante y capaces de moverse de un insecto a otro. Ellos contienen reservas de energía en carbohidratos, no se alimentan y pueden sobrevivir cuando las condiciones son favorables (humedad, temperatura apropiada y oxígeno disponible). Miden de 400 a 1500 micras dependiendo del largo de las especies (Woodring and Kaya, 1988).

El ciclo descrito requiere de 10 a 14 días para *S. Sterneinerma feltiae* en los últimos instares de *Galleria mellonella* L. En pequeños insectos puede permitir solamente una generación. El ciclo de vida de *Heterorhabditis* es esencialmente igual al de *Steinernema* (Woodring and Kaya, 1988).

2.1.3. Búsqueda y Penetración.

Estos nemátodos poseen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante (Lewis *et al.*, 1993). Algunas especies manifiestan el tipo de “espera pasiva” (ambusher) en la que los individuos permanecen cerca o en la superficie del suelo e infestan a los insectos móviles que se alimentan en la interfase del suelo y los que tienen una estrategia de “búsqueda activa” (cruiser) como ocurre en *H. bacteriophora* que tienden a ser muy móviles y responden a las emanaciones químicas de los hospedantes, infestando fundamentalmente a los insectos menos móviles.

2.1.4 Proceso de infección.

Una vez que el nemátodo se instala en el hemocele, libera las células de la bacteria a través del ano, las que proliferan y matan al insecto a partir de las primeras 24 h, modificando los tejidos y creando condiciones para permitir el desarrollo de los nemátodos, que se alimentan tanto de los tejidos semidegradados como de las propias células bacterianas. Rápidamente ocurre el paso al cuarto estadio los que darán origen a adultos hermafroditas (*Heterorhabditis*) o machos y hembras (*Steinernema*). Una o más generaciones anfimicticas pueden ocurrir en el hospedante hasta que escasea el alimento, momento en que los juveniles infestivos abandonan el cadáver y buscan de un nuevo insecto (Kaya *et al.*, 1993). (Anexo #1)

2.1.5. Mecanismo de Supervivencia

Debido a que estos nemátodos son muy susceptibles a condiciones ambientales extremas han desarrollados los siguientes mecanismos de supervivencia. (Ishibashi & Kondo, 1990)

1. Agregación

- Ocurre comúnmente en muchas especies de nemátodos y les permiten protección contra la desecación y radiación solar (Wallace & Doncaster, 1964). En este caso, los nemátodos de la periferia mueren y actúan como una barrera que protege, contra factores ambientales adversos, a los individuos en el centro.

2. Inactividad

- Si bien la movilidad constituye una ventaja en la búsqueda activa de los

hospedantes, la inactividad que puede desarrollar, se convierte en una ventaja para su supervivencia al reducir el uso de sus reservas energéticas y no resultan atractivos para sus depredadores, reduciéndose las probabilidades de ser encontrados por sus enemigos. (Ishibashi & Kondo, 1986; Timper & Kaya, 1989).

3. Deshidratación

- La pérdida de gran parte del contenido de agua de sus organismos hasta el punto donde el metabolismo es completamente detenido da como resultado un estado de suspensión total de la animación denominado “criptobiosis adherida biótica”. Esta puede desarrollarse tanto en el ambiente actual como en condiciones de laboratorio (Womersley, 1990).

2.1.6. Asociación Mutualista Nemátodo- Bacteria.

La interrelación entre el nemátodo y la bacteria se considera simbiótica porque el nemátodo no se puede reproducir dentro del hospedante sin la acción de la bacteria y esta no puede penetrar a la hemolinfa del insecto para reproducirse y causar la infección si el nemátodo no la transporta (Georgis, 1992) ya que se ha demostrado que no es patógena cuando se ingiere directamente (Milstead, 1979; citado por Valdés, 2003).

En la simbiosis, el nemátodo posibilita la protección de la bacteria no solo ambiental sino incluso, es capaz de destruir el sistema inmune del insecto con la producción de toxinas extracelulares garantizando de esta forma el desarrollo bacteriano (Akhurst y Boemare, 1990). Además facilita el transporte de la bacteria desde un cadáver a otro organismo hospedante.

2.1.7. Rango de hospedantes.

Más de 1000 especies de insectos pertenecientes a los ordenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Orthoptera*, *Isoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera* y *Hemiptera*, entre otros han resultado ser hospedantes de los nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y campo (Alatorre y Hernández, 2000).

2.1.8. Efectividad y Estrategias de aplicación en plagas agrícolas.

Los nemátodos entomopatógenos son compatibles con algunos insecticidas clorinados, carbamatos y órgano fosforados en solución acuosa (Kaya, 1985). Ciertos funguicidas, acaricidas, insecticidas y herbicidas no afectan o tiene poco efecto sobre los infestivos juveniles, potencialmente es factible su aplicación combinada, como lo demuestran los resultados de Rovesti *et al.* (1989); Zimmerman y Cranshaw (1990) y Head *et al.* (2000).

En cuanto a los medios biológicos Kaya y Burlando (1989) descubrieron que *Bacillus thuringiensis* (Bt) también puede ser combinado con los nemátodos entomopatógenos, ellos observaron que los infestivos juveniles de *Steinernema carpocapsae* penetraron igualmente insectos infestados por Bt que los sanos, pero que los primeros murieron más rápido.

Castellanos (2000) estudió en condiciones de laboratorio el parasitismo de los nemátodos entomopatógenos *H. bacteriophora* (HC₁) y *Steinernema* sp. (SC₁) sobre varias especies del Orden *Homoptera*: *Coccus viridis* Green (*Coccidae*), *Aphis gossypii* (*Aphididae*), *Aleuroglandulus malangae* y *Bemisia tabaci* (*Aleyrodidae*). En la evaluación realizada a las 72 horas se determinó que *H. bacteriophora* resulto más eficiente que *Steinernema* sp. sobre las especies de insectos evaluadas con mas de 80% de mortalidad en todas las especies excepto en *tabaci* con un 38.9%.

2.1.9. Reproducción Masiva ‘in vivo’

En este tipo de reproducción se utiliza los insectos como pequeños reactores biológicos y generalmente se emplean larva de *Galeria mellonella*, lepidoptera conocido como “polilla de la cera o de los apiarios” debido a su disponibilidad comercial (Woodring & Kaya, 1988). Tanto en el inoculo como en el producto del proceso se utilizan los estadios juveniles.

Generaciones de nemátodos se desarrollan dentro del cuerpo de las larvas del insecto a temperaturas entre 20 – 25 °C durante unos 10 días y son colectados

empleando las denominadas “Trampas White” (Woodring & Kaya, 1988). Según estos autores, los rendimientos promedios que se obtienen oscilan entre 30000 – 50000 juveniles/larva. Sin embargo, recobrados mayores han sido reportados por otros autores; por ejemplo, Milstead & Poinar, 1978, reportaron un rendimiento de 350000 juveniles de *H. bacteriophora*.

El proceso completo para desarrollar con éxito la cria ‘*in vivo*’ de nemátodos entomopatógenos aparece detallado en los trabajos de Wouts (1994) y Woodring & Kaya (1988).

Uno de los problemas que se presentan en este tipo de reproducción lo constituye la dieta de *Galleria mellonella* (Rodríguez et al., 2007) consistente en leche en polvo, arroz, salvado de trigo, miel de abejas, reducida en sus componentes por Alemán 1999, pero que todavía reserva en ellos Afrecho, Germen de trigo, Harina de Soya, Maíz, Salvado de Trigo, Torula, Miel de abejas, Jarabe Sucro y Formaldehído, lo que la hace prácticamente incosteable.

A través de especies susceptibles como el gusano palomilla del maíz demostrada sus susceptibilidad a especies de Nemátodos entomopatógenos (Pozo, 2000) pudiera obtenerse un hospedante alternativo a *G. mellonella* para la reproducción en CREE de los nemátodos entomopatógenos.

2.1.10. Producción de los Nemátodos Entomopatógenos

La producción, almacenamiento y distribución de bioplaguicidas se presenta a veces como un problema. (Waage, 1997). Dentro de estos problemas citamos:

1. Aspectos económicos:

- Capital
- Acceso a sustratos
- Cultivos que desarrollan
- Transportación
- Conservación
- Necesidades de disminuir importaciones, etc.

- Los laboratorios deben poseer:
- Ubicación y acceso.
- Fuente agua y calidad del agua.
- Condiciones de limpieza de locales, cristalería. Insumos de bioseguridad.
- Proveedores de materias primas y calidad.
- Expediente maestro para producciones.
- Registro de operaciones.
- Registro de lotes y calidad.
- Mantener sistemática capacitación de sus operarios y técnicos.
- Ofrecer asistencia técnica para el uso de ACB.

2.2 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

2.2.1. Aspectos Generales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith.)

Ubicación taxonómica de la palomilla del maíz.

Según Zayas (1989) y Rojas (2000) tiene la siguiente ubicación taxonómica:

Clase: *Insecta*.

Orden: *Lepidóptera*.

Suborden: *Heterocera*.

Superfamilia: *Noctuoidea*.

Familia: *Noctuidae*.

Subfamilia: *Amphipyrinae* (= *Acronyctinae*).

Género: *Spodoptera*.

Especie: *frugiperda* (J. E. Smith).

2.2.2. Características de *S. frugiperda*.

La apariencia general de la larva de gusano cogollero (anexo 1) varía en color desde canela claro hasta verde o negro. Tres líneas amarillentas corren hacia abajo de la espalda desde la cabeza hasta la cola. Estas están bordeadas en cada lado por una banda oscura y una banda amplia amarilla con marcas rojizas tenues o manchas o ronchas (Heinrichs et al., 2004).

Las larvas tienen cuatro pares de pseudopatas abdominales carnosas en añadidura al par en la parte final del cuerpo. Sobre la cola hay ocho tubérculos o protuberancias de color oscuro, cada uno con una seta fuerte o pelo ascendente de ésta. Las larvas bien crecidas son de alrededor de 30 a 44 mm de largo. La pupa, aproximadamente de 13 mm de largo, es al inicio rojizo-café, pero se oscurece hasta negra conforme está madura (Heinrichs et al., 2004).

Murillo (1991) expone que las larvas recién eclosionadas son de color blanco o cremoso, están cubiertas por pequeños puntos negro pubescentes y su cabeza es negra. Las suturas epicraneales, están bien marcadas formando una Y invertida característica. Estas conservan en todos sus estados protuberancias dispuestas en todos los segmentos sobre las cuales se presentan vellos. El cuerpo puede tomar color castaño claro, castaño oscuro o verde pálido, con una línea media longitudinal de color café oscuro entre dos líneas laterales en igual sentido de color castaño claro.

Este mismo autor señala que los adultos son mariposas de color pardo morado más claro en los machos que en las hembras. Los machos tienen en las alas anteriores, hacia la mitad, una mancha clara ovalada conspicua que va unida a una mancha oblicua en forma de Y del mismo color. Las hembras también presentan en las alas anteriores una mancha oblicua ovalada y otra mancha de forma irregular menos visible.

S. frugiperda es una de las especies más importante debido a la diversidad de plantas cultivadas y no cultivadas sobre las cuales puede alimentarse. En cultivo como maíz y sorgo representa el mayor problema como “cogollero“, razón por la cual se denomina con este nombre. Sin embargo, como trozador causa también daños de importancia en la mayoría de cultivos comerciales como sorgo, maíz, soya, algodón y arroz, para citar solamente los de mayor extensión (Murillo, 1991).

El ciclo de vida del gusano cogollero es similar a aquellos de los gusanos peloteros y soldados. Los huevos son depositados en masas de hasta 300, generalmente sobre

la superficie de las hojas de las plantas hospedantes, tales como pastos alrededor de los bordes de los campos. Los huevos grises esféricos son cubiertos con un abrigo de escamas de la palomilla o pelusas. Son primero de color verde y luego cambian a café claro según lo expuesto por Sanidad Vegetal (1999). Las larvas eclosionan en 3 a 5 días, se alimentan de los remanentes de las masas de huevos, y se mudan hacia el cogollo. Ellas viven de 14 a 21 días pasan por 5 o 6 estadios. Los primeros estadios son verdes con manchas y líneas negras dorsales después se vuelven verdes con manchas y líneas espiraculares y dorsales negras, café o casi negras (King y Saunders, 1984). Presentan una Y amarilla invertida en la cabeza según Dill y Handley (1996).

Cuando son abundantes, las larvas pueden comer toda la comida disponible y luego entonces mudarse en multitudes a campos cercanos. Después de alimentarse por 2 a 3 semanas, las larvas barrenan alrededor de 20 mm dentro del suelo para pupar. Este estadio dura 9 a 13 días. Las pupas son de color café y de 18 – 20mm de largo. Dentro de dos semanas, un enjambre nuevo de palomillas emerge, generalmente volando algunas millas antes de poner huevos. Es una mariposa de hábitos nocturnos que se alimenta copula y ovoposita de noche. Las alas delanteras en las hembras son de color uniforme de gris a café- gris mientras que en el macho son beige con marcas oscuras y rayas pálidas en el centro del ala. Las alas traseras en ambos sexos son blancas según lo descrito por King y Sainder (1984). Pueden ocurrir 3 a 4 generaciones por año (Madrigal, 1980). Su ciclo biológico se completa en un mes aproximadamente.

2.3. Dieta Artificial de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* pueden ser alimentadas con una dieta artificial, la cual es elaborado de acuerdo al siguiente procedimiento: a 10L de agua hervida, se agregó granos de frijol y arroz. Se mantuvo por 45 minutos hasta que perdieron su dureza, después se agregó el resto de ingredientes uno por uno mezclándolos lentamente en el recipiente. La mezcla se hirvió por tres minutos y enseguida se licuó agregando a cada vasito 10 mL de dieta la cual se dejó en reposo hasta que se solidificó. Como se puede apreciar, la crianza de *Spodoptera frugiperda* con dieta

artificial tiene un precio muy elevado.

Ingredientes	Cantidad (g)
Agar	110
Frijol de Soya	250
Germen de Trigo	200
Proteína de Soya	200
Leche en polvo	140
Levadura	200
Acido Ascórbico	18
Acido sórbico	9
Vitaminas	30
Tetraciclina	250 (mg)
Formalina pura	18 (ml)
Metil parabencen	15

Tabla 1. Ingredientes de la dieta artificial para *Spodoptera frugiperda*, Zamorano, Honduras, 2006.

2.4. Crianza con Dieta Natural

Según Marengo (1988) en su trabajo sobre los parasitoides de este insecto en maíz, cada larva del gusano del cogollero consume 91cm² de hojas de maíz, de ellos más 2cm² esclerotiza en sus estados iniciales. En condiciones de laboratorio, se enfrentan al problema de que las hojas se deshidrataban fácilmente, dificultando la ingestión por parte de los insectos y promoviendo el canibalismo entre ellos (Álvarez, 1991). Por tal razón, solo se utilizan hojas tiernas, libres de enfermedades y parasitoides y deben ser cambiadas diariamente. Con lo referido por Castro *et al.* (2009) las larvas de *Spodoptera frugiperda* pueden ser alimentadas con una dieta natural de *Sorghum halepense* (Don Carlos) u hojas de *Zea mays* (maíz), sin diferencias significativas en el desarrollo del insecto.

Según Castro *et al.* (2009), con una dieta a base de hojas tiernas de maíz, los huevos de esta especie tardaron entre cinco y seis días en promedio para eclosionar, el desarrollo larval fue de 21,6 días en promedio, el periodo pupal ocupó alrededor de 20,3 días y la fase de adulto, 18,4 días, por lo que el ciclo de vida promedio fue de 47,40 días, comparando con el ciclo de vida promedio con dieta artificial de 45,10 días. (Tabla 2)

Estadio	Dieta Artificial	Dieta Natural
Huevo	3,00	5,50
Larva	26,80	21,60
Pupa	15,30	20,30
Total	45,10	47,40

Tabla 2. Duración promedio (días) de cada etapa del ciclo de vida del cogollero del maíz (*S. frugiperda*), alimentado con hojas tiernas de maíz y con la dieta artificial bajo condiciones ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo) no controladas.

3. Materiales y Métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), ubicado en la Universidad Central de Las Villas (UCLV), entre los meses de febrero de 2010 a junio de 2010.

En la realización del mismo se colectaron insectos de la especie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith.) (Lepidoptera; Noctuidae), en el estado de huevo y larva, provenientes de campos de maíz (*Zea mays* L.) y se procedió a una cría sucesiva de esta especie según la metodología de Armas y Ayala (1990) y Gómez *et al.* (1994) para obtener individuos libres de enfermedades y parasitoides.

Se utilizaron masas de huevos de *S. frugiperda* obtenidos de campos de maíz. Las masas de huevos se colocaron en pomos con alimento natural *Sorghum halepense* (L.) Pers. (Don Carlos) y cuando emergieron las larvas se dejaron crecer hasta cumplir el estadio para ser utilizadas en los bioensayos según la tecnología obtenida por Gómez *et al.* (1994)

Las larvas colectadas se transfirieron a tubos de ensayos y placas en los que previamente se había colocado hojas tiernas de *S. halepense*, que les sirvieron de alimento y que fueron cambiadas todos los días hasta que las larvas llegaron a la etapa de pupa.

Se realizaron observaciones de cada ejemplar diariamente, se observó el cambio de instar, y se utilizó el método referenciado por Chacón *et al.* (2009).

3.1. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera; Noctuidae) al nematodos entomopatógeno *Heterorhabditis indica* Poinar cepa P₂M

Se utilizó la especie *Heterorhabditis indica* Poinar cepa P₂M (Fisher Le-soux, 1998), provenientes del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal y reproducida en el laboratorio de patología de insectos del CIAP. Las suspensiones de nematodos

fueron preparadas por dilución según lo orientado por Kaya y Stock (1997). A partir de la solución madre se tomaron 1mL de nematodos y se diluyeron en 100 mL de agua.

Los conteos se realizaron bajo el microscopio-estereoscopio "Olympus", calculándose la concentración de nematodos de la solución madre original mediante las fórmulas expuestas por Woodring y Kaya (1988):

$$S = N * \frac{1}{M} * (x+1)$$

Donde: S – concentración (n/mL.) de la solución inicial.

N - número de nematodos por conteo (mínimo 2)

M – numero de mililitros en la placa Siracusa

x+1 - factor de dilución

Luego de calculado S para hallar las concentraciones necesarias para los experimentos, se utilizó la formula dada por Woodring y Kaya (1988) para calcular la cantidad específica de nematodos por larva (n/larva) que se aplicará:

$$A = \frac{D * C}{B}$$

Donde:

A – volumen inicial de concentración conocida para ser diluida

B – número de n/mL en el volumen inicial para ser diluido

C – volumen final (mL) de la nueva dilución

D – número de n/mL en el volumen final de la nueva dilución

Como lo que se necesita calcular es el valor de C, se reajustó la formula de la manera siguiente:

$$C = \frac{A * B}{D}$$

Se realizó una evaluación sobre larvas de los instares III, IV y V de *S. frugiperda* con nematodos entomopatógenos con la especie *Heterorhabditis indica* cepa P₂M, de

acuerdo a lo sugerido por Bedding (1990) para verificar si era susceptible a los mismos. Los insectos (10 individuos por tratamiento) fueron colocados en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre un papel de filtro y posteriormente fueron inoculados con 250 n/larva en 1 mL y 500 n/larva en 1 mL; volumen empleado por cada placa. Las evaluaciones se realizaron a las 24 horas después de la inoculación. Se tomaron 10 larvas como control, sin inoculación de nematodos para un total de 200 insectos.

Posteriormente, el 25% de los cadáveres se disertaron en solución salina estéril bajo el Microscopio estereoscopio, realizando la verificación de la penetración en los insectos y la comprobación de la muerte de los mismos debido a la acción de los nematodos. El 75% restante de los cadáveres fueron colocados en trampas “White” para obtener los infestivos juveniles 3 (IJ₃) y dar continuación al presente estudio.

3.2. Determinación del instar más susceptible

Se realizaron evaluaciones sobre los instares larvales II, III y IV de *S. frugiperda* determinando cual es el instar de la plaga que presenta mayor susceptibilidad a los nematodos entomopatógenos.

Se utilizó la especie *H. indica* cepa P₂M, en suspensiones de concentraciones que variaron desde 20 n/larva hasta 120 n/larva.

Se seleccionaron las larvas por instar y se emplearon 10 individuos por tratamiento fueron colocados en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre un papel de filtro y posteriormente fueron inoculados con 20 n/larva, 40 n/larva, 60 n/larva, 80 n/larva, 100 n/larva y 120 n/larva. Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas después de la inoculación hasta completar las 72 horas. Se tomaron 10 larvas por cada uno de los instares como control, para un total de 210 insectos.

Al control se le aplicó 1 mL de agua destilada y estéril, con la misma cantidad de individuos por placa y del total del experimento. Se compararon contra los tratamientos con nematodos y por instares.

3.3. Empleo de varias concentraciones de *H. indica* P₂M contra el instar V de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

Para conocer la potencialidad en la multiplicación y producción de los nematodos entomopatógenos sobre larvas del instar V de *S. frugiperda* se empleo la cepa P₂M. Los insectos fueron colocados en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre un papel de filtro, aplicándose 1 mL por cada placa de la suspensión con 4 concentraciones diferentes. Se colocó un insecto por placa para un total de 12 placas por dosis de aplicación. Se empleó un control que constituyó una réplica de 12 insectos, sumando un total de 108 insectos ya que se utilizaron dos dosis de inoculación para esta prueba, estas dosis fueron 25, 50, 75 y 100 n/larva, suspendidos en 1 mL.

Las evaluaciones se realizaron a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación y se comparó el porcentaje de mortalidad de los insectos por cada instar y la velocidad de las muertes de las larvas.

3.4. Evaluación del instar más productivo en la reproducción de los Infestivos Juveniles (IJ₃)

Para conocer cual es el instar más productivo de *S. frugiperda* en la potencialidad de multiplicación y reproducción de los nematodos entomopatógenos con el empleo de la cepa P₂M, se colocaron insectos en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre un papel de filtro, aplicándose 1 mL por cada placa de la suspensión con 2 concentraciones diferentes: 250 n/larva y 500 n/larva a los instares III, IV y V.

Se colocó un insecto por placa para un total de 12 placas por dosis de aplicación y por instares. Se empleó un control que constituyó una réplica de 12 insectos, colocados individualmente en placas petri a los que se le aplicó 1 mL de agua destilada y estéril, sumando un total de 108 insectos.

Posteriormente, se escogieron 2 cadáveres por instar por cada dosis de inoculación y se disertaron en solución salina estéril bajo el Microscopio estereoscopio, realizándose la verificación en los insectos de la existencia en su interior de los nematodos y la comprobación de la muerte por los mismos, a consecuencia de la

acción de los nematodos. Los cadáveres restantes fueron montados en trampa "White" a los 6 y 9 días después de montado el experimento y se contó la cantidad de infectivos juveniles (IJ₃) que fue capaz de salir del cuerpo del insecto, comparando cuales son los instares larvales que pueden ser empleados en la producción de los nematodos entomopatógenos.

Se determinaron los cambios de coloración y la consistencia del cuerpo de las larvas una vez parasitadas y muertas por la acción del nematodo entomopatógeno.

3.5. Determinación de las correlaciones existentes en cuanto a morfología del cuerpo de *Spodoptera frugiperda* en comparación con *Galleria mellonella* L.

Para conocer la posibilidad de obtención de nematodos entomopatógenos de larvas de los últimos instares de *S. frugiperda* y *G. mellonella* se compararon en cuanto al peso de las mismas y en cuanto a la producción de nematodos de forma matemática.

Se realizaron pesajes de las larvas con el uso de una balanza digital y se determinaron las relaciones entre una larva y otra, para así obtener el potencial de reproducción de los NEPs en estas larvas.

3.6. Análisis estadísticos

Todos los resultados obtenidos a través de las investigaciones realizadas en este trabajo fueron analizados y procesados por programas y software soportados sobre Microsoft Windows XP service Pack 3. En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el paquete de programas Stargraphic plus ver. 5.0 para Windows y sus programas ANOVA, realizando la prueba de Duncan con un nivel de confianza de un 95% para determinar diferencias significativas.

4. Resultados y Discusión

4.1. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera; Noctuidae) al nematodo entomopatígeno *Heterorhabditis indica* Poinar cepa P₂M

Las pruebas de susceptibilidad de *S. frugiperda* a los nematodos entomopatógenos demostraron que las larvas de estos insectos son susceptibles a estos controles biológicos. Los IJ₃ de la cepa de nematodo utilizada fueron capaces de provocar la muerte de las larvas de este lepidóptero antes de las 72 horas después de la aplicación; estos resultados coinciden con los expuestos por Ehler (1998) quien refiere que las larvas de polillas son susceptibles a estos nematodos. A las 72 horas cerca del 100% de las larvas murieron por acción de los nematodos aplicados (figura 1).

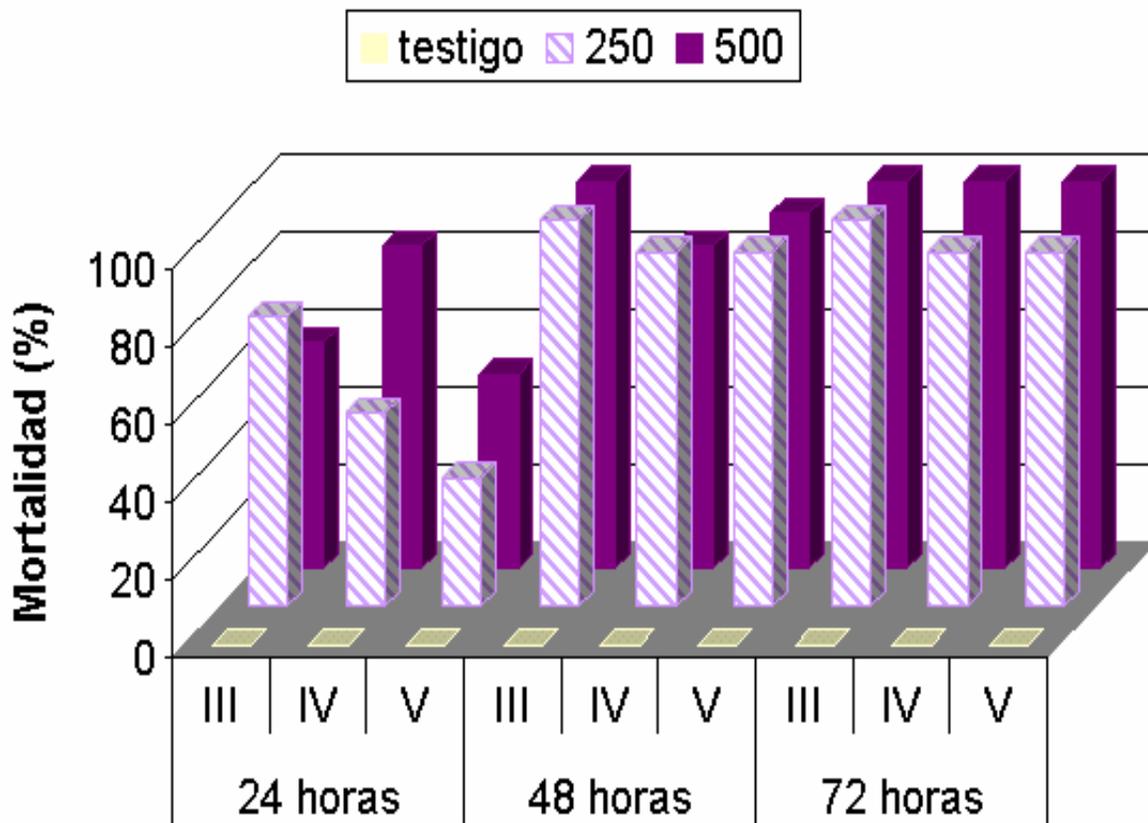


Figura 1. Susceptibilidad de los instares larvales de *S. frugiperda* a los nematodos entomopatógenos

Al examinar las larvas de los insectos bajo el microscopio, se comprobó una gran cantidad de infectivos vivos sobre la superficie de las mismas, coincidiendo con lo señalado por Forschier y Garrner (1991) y Quintero (2003) cuando afirman que los IJ₃ son atraídos hacia los cuerpos de los insectos donde buscan aberturas naturales de los individuos para penetrar a través de ellos y provocar la muerte de las mismas a los días post-inoculación.

A través de la prueba de necrosis se comprobó que gran cantidad de nematodos se encontraban dentro de los cadáveres de los insectos, observándose hembras gigantes en el mismo, característica que presentan estos organismos cuando existe abundancia de alimento. En este caso esto reviste gran importancia ya que es un resultado beneficioso para implementar los sistemas de control basados en NEPs sobre algunas plagas agrícolas debido a que pueden infestarse y morir en lugares diferentes, lo que facilita la diseminación de nemátodos entomopatógenos en los campos.

El tratamiento testigo presentó 0% mortalidad, confirmando la ausencia de entomopatógenos en los insectos empleados en el experimento. La mayor mortalidad fue alcanzada con la dosis de 500 n/mL en el cual se observó el 100% de mortalidad a las 72 horas en los tres instares evaluados.

Al montar las larvas inoculadas en trampas “White” se comprobó la salida de los NEPs del cuerpo del hospedante, con gran vitalidad, garantizando de esta forma que se obtengan IJ₃ capaces de buscar otros insectos que pueden ser hospedantes del nematodo.

4.2. Determinación del instar más susceptible

La relación existente entre el tratamiento con la cepa P₂M, los instares II, III y IV y el porcentaje de muerte de las larvas de *S. frugiperda* mostró que para las concentraciones de 100 y 120 n/larvas a las 48 horas la mortalidad resultó ser del 100% (Figura 2). En este experimento muy pocas concentraciones causaron la muerte al 100% de las larvas evidenciando cierta resistencia de estos instares

larvales a pequeñas dosis de inoculación. El instar más susceptible fue el segundo, donde se aprecia la susceptibilidad superior de este instar sin importar las concentraciones.

Estos resultados coinciden con Gómez (1981), que expone “las larvas jóvenes resultan más susceptibles que las larvas viejas para la mayoría de las enfermedades”. El instar que le siguió fue el tercero y luego y cuarto, que en algunos casos como en altas concentraciones (80 y 100 n/larva) se comportaron con cierta resistencia a los nematodos entomopatógenos debido, entre otras cosas, a que las larvas son de mayor tamaño y su sistema inmunológico está más desarrollado.

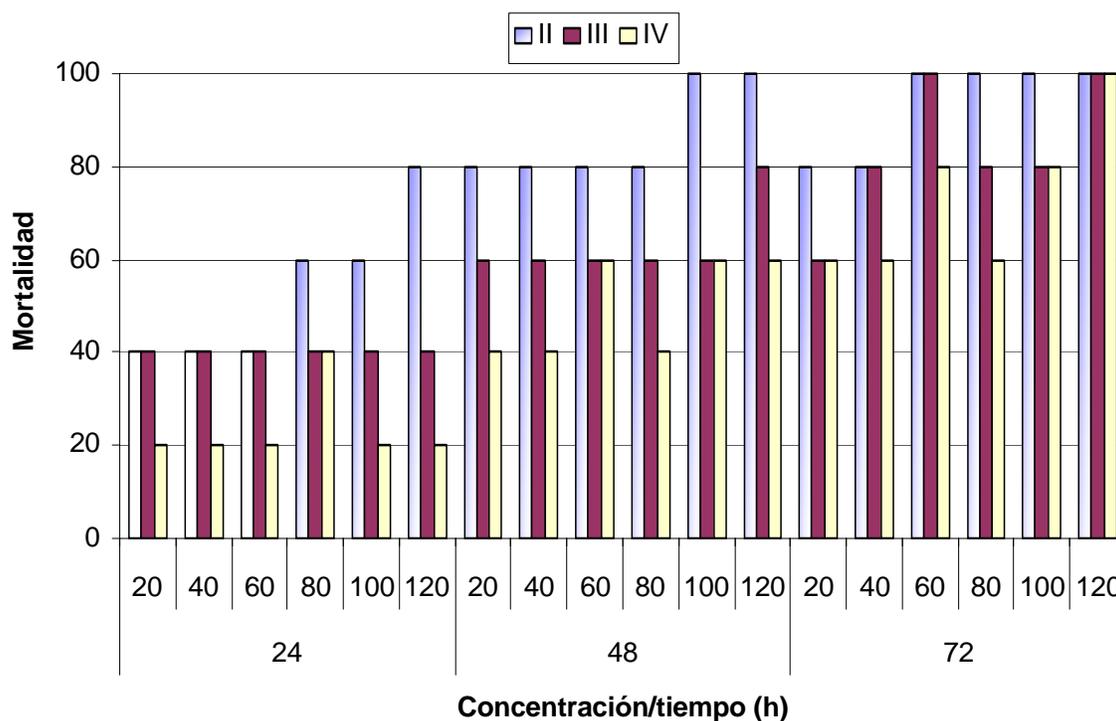


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* a diferentes concentraciones de la cepa de nematodos entomopatógenos P₂M

Estos resultados coinciden con Marrero (2003) cuando en pruebas realizadas con otras cepas de nematodos entomopatógenos, al realizar estudios con los instares II y

III de *S. frugiperda* determinó al II instar larval como el más susceptible, corroborando los resultados obtenidos en esta experiencia con la cepa P₂M.

Estos resultados evidencian que *S. frugiperda* en su estado larval es susceptible a los nematodos entomopatógenos y por lo tanto, se puede utilizar como hospedante alternativo en la reproducción masiva “in vivo” de los mismos.

4.3. Empleo de varias concentraciones de *H. indica* P₂M contra el V instar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

Para la cepa P₂M el porcentaje de muertes de las larvas de *S. frugiperda* fue de un 100 % para el caso de 100 n/larva y se alcanzó niveles de 80 % de mortalidad en concentraciones inferiores a 100 n/larva (tabla 3).

En las comparaciones realizadas entre las concentraciones de nematodos empleadas resultó que existen diferencias significativas entre las concentraciones de 100 con respecto a 25 y 50 n/larva, aspecto este que es de esperar, pues varios autores refieren que la concentración de bacterias simbiótica *Photorabdus luminescens* para provocar la muerte del insecto es directamente proporcional a la cantidad de nematodos que penetran al cuerpo del hospedante.

Tabla 3. Diferencias estadísticas en cuando a la concentración empleada en el experimento

Concentraciones (n/larva)	Media	Signific.
25	0.32	b
50	0.3067	b
75	0.3467	ab
100	0.4933	a
EE (X)±	0.0553	

*Letras diferentes denotan diferencias significativas según Duncan para un alfa de 0.05.

Al analizar el tiempo en que los NEPs causaron la muerte de las larvas, o sea la velocidad para matar (tabla 4), se aprecia que existe siempre un retardo para causar el 100 % de mortalidad a las larvas tratadas entre 24 y 72 horas debido en lo

fundamental a que la acción de la bacteria y el nematodo que en las larvas del V instar retarda su actividad.

Tabla 4. Diferencias en cuanto al tiempo para provocar la muerte de *S. frugiperda*

Tiempo	Media	Significancia
24	0.0333	c
48	0.3833	b
72	0.6667	a
EE (X)±	0.053	

*Letras diferentes denotan diferencias significativas según Duncan para un alfa de 0.05.

4.4. Evaluación del instar más productivo en la reproducción de los Infestivos Juveniles (IJ₃)

Al evaluar cual es el instar a utilizar para reproducir los NEPs, el instar de *S. frugiperda* más productivo fue el quinto en ambas dosis de inoculación (250n/larva y 500n/larva). Podemos apreciar (tabla 5) que para la dosis de 250 n/larva, solo larvas de quinto instar pudieron ser cosechadas. Esto se debió al rompimiento por la acción de los nematodos entomopatógenos de la pared del cuerpo de las larvas de estos instares, al parecer estas larvas mucho más jóvenes en edad y de tamaño menor no resistieron los ciclos de vida de esta concentración, mientras que si ocurrió con la concentración de 500 n/larva, por ser más demorado el ciclo y alcanzar en este una cantidad de nematodos que le impidió proseguir en más de una generación. Con una dosis de 500 n/mL todos los instares podrían ser cosechados, pero las larvas del quinto instar resultaron las más productivas de todas evaluaron.

Tabla 5. Nematodos cosechados y cosecha promedio por larva de *Spodoptera* de los instares III, IV y V y dosis de inoculación (n=12)

INST AR	Dosis (n/larva)	Larvas cosechadas	Tiempo en morir (horas)	Nematodo Cosechado (n/mL)	Promedio de NEPs por larva (n/larva)
III	500	4	24 - 7 larvas 48 - 5 larvas	35 400	8 850
	250	0*	24 - 9 larvas 48 - 3 larvas	No salieron del cuerpo	-
IV	500	2	24 - 10 larva 36 - 1 larva.	81 900	40 950
	250	0*	24 - 6 larvas 48 - 5 larvas	No salieron del cuerpo	-
V	500	8	24 - 6 larvas 48 - 5 larvas 72 - 1 larva	682 000	85 250
	250	6	24 - 4 larvas 48 - 7 larvas.	141 400	23 557

*. Larvas con paredes celulares destruidas por la acción de los nematodos.

Estos resultados pueden explicarse por el propio ciclo de los nematodos entomopatógenos (ver anexo 1), que al ser pocos los que penetran en el cuerpo de las larvas pueden tener varios ciclos y aumentar su número poblacional en progresión que por la propia actividad del nematodo rompa y destruya la pared del cuerpo, no ocurriendo esto cuando su número (500 n/larva) es mayor, pues no se repite el ciclo, sólo una vez y este se hace más lento, corroborando los estudios clásicos que sobre el ciclo de vida dentro del hospedante han efectuado Woodring and Kaya (1988); Kaya and Burlando (1989); Kaya *et al.* (1993) y Kaya y Gaugler. (1993).

Las características morfológicas externas de la larva y la consistencia de su anatomía evidenciaron que la misma, por la acción de los nematodos, una vez liberada la bacteria dentro del *hemocele* del insecto, a partir de las 48 horas, se

torno la larva de un color pardo amarillenta, evolucionando a pardo rojizo a las 120 horas y pardo oscuro a las 192 (día de la cosecha). (Tabla 6)

La cosecha estuvo dada por el hecho de que a partir del 5^{to} día las larvas muertas de *Spodoptera* cambiaron la consistencia de los cadáveres a momificados, momento óptimo para la salida de los NEPs del hospedante en la naturaleza, y para realizar la prueba de necrosis efectuada.

Tabla 6. Evolución, Prueba de Necrosis y Eficiencia por Instar con dosis de 250 y 500 n/larva a los 2, 5 y 8 días

Instar	Dosis	Coloración del cuerpo			Consistencia del cuerpo			Prueba de necrosis	Trampa "White" (n/larva)
		2 (48h)	5 (120 h)	8 (192 h)	2 (48 h)	5 (120 h)	8 (192 h)		
III	250	P. A.	P. A.	P. O.	F	M	M	(+)	(-)
	500	P. A.	P. O.	P. O.	F	M	M	(+)	8 850
IV	250	P. A.	P. A.	P. O.	F	F	M	(+)	(-)
	500	P. R.	P. O.	P. O.	F	M	C. H	(+)	40 950
V	250	P. A.	P. R.	P. O.	F	M	M	(+)	23 567
	500	P. R.	P. A.	P. O.	F	M	C. H	(+)	85 850

P.A: Pardo Amarillento; P.R: Pardo Rojizo; P.O: Pardo Oscuro; (+): Positivo; (-): Negativo;

F: Flácido; M: Momificado; C.H: Cuerpo Hidratado (rompimiento dela pared del cuerpo)

Al colocarlos en el sistema "White" o puente se pueden obtener que para larvas del III instar 8850 nematodos IJ₃, para un incremento de 17,7 veces lo inoculado. Para el IV instar este incremento fue de 81.9 veces y para el V instar fue para 250 n/larva de 47.194 veces, mientras que para la inoculación de 500 n/larvas fue 171.7 veces, lo cual es sin dudas una reproducción del nematodo que puede considerarse buena.

Estos resultados demuestran la posibilidad de recurrir a un hospedante alternativo en los Centro de Reproducción de Entomopatógenos del MINAGRI, que no poseen crías de *Galleria mellonella* (L.) hospedante de la mosca *Lyxophaga diatraea* (Townsend) que son líneas de producción de los CREE del MINAZ.

Estos resultados para potenciar a esta especie como hospedante de nematodos en reproducción masiva de los mismos resalta el papel que posee este insecto, que en otras investigaciones como la realizada por Chacón *et al.*, 2009 recomendaron el empleo de *S. frugiperda* como hospedante para la reproducción de biocontroleros como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill.

En cuanto a los días de cosecha se pudo observar que en la medida que transcurre se van agotando las emersiones de los IJ₃ desde los cadáveres de *S. frugiperda* (Figura 3). Se puede apreciar como al tercer día los rendimientos de nematodos IJ₃ son prácticamente nulos, por lo que se recomienda hasta 2.5 días de extracción de IJ₃ con el sistema “White”.

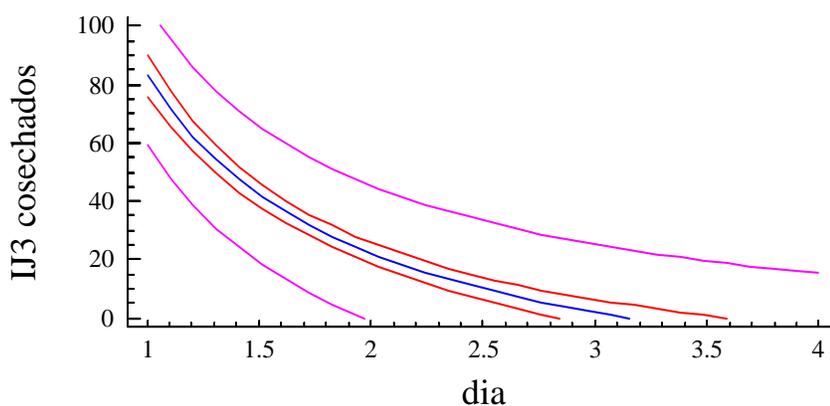


Figura 3. IJ₃ Cosechados por el sistema “White” o Puente

Estos resultados coinciden con varios autores, quienes han aportado que a partir del tercer día comienzan a decomponerse los cuerpos de *G. mellonella* y las capas de grasa de sus cadáveres forman una capa en la superficie del agua destilada que atentan contra el intercambio gaseoso que debe ocurrir para que los nematodos

entomopatógenos no mueran (Woodring and Kaya, 1988), además de las posibilidad de contaminaciones externas de la suspensión obtenida.

4.5. Relación de las larvas de los últimos instares de *G. mellonella* y *S. frugiperda*

Para la relación de pesos de las larvas se escogieron las larvas del VI instar de *S. frugiperda* y del V de *G. mellonella*. Se puede apreciar como siempre el peso de grupos de larvas de *S. frugiperda*, superó a las larvas de *G. mellonella* (figura 4), sin embargo los rendimientos en cosecha de los nematodos entomopatógenos siempre fueron menores y con diferencias significativas entre ellos.

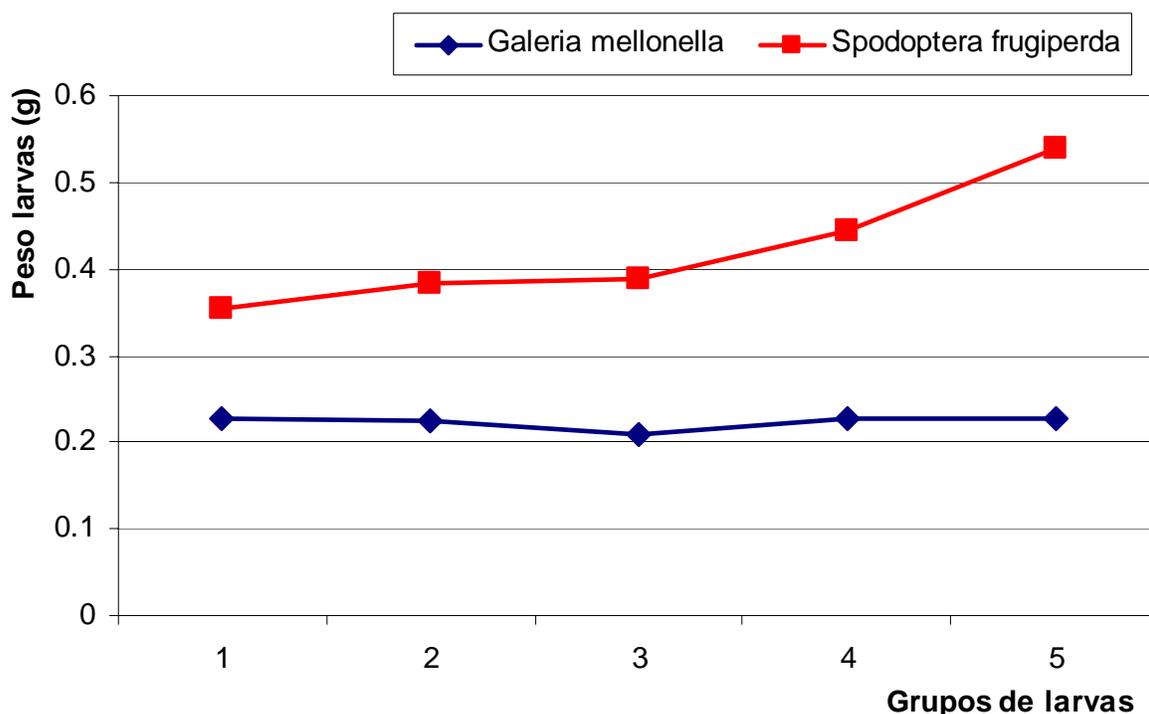


Figura 4. Relaciones de peso de larvas de los últimos instares de *G. mellonella* y *S. frugiperda*

Cuando se comparan los rendimientos de las larvas de *G. mellonella* con las de *S. frugiperda*, evidenciados estos último en los epígrafes anteriores se puede destacar, que *G. melonella* posee rendimientos de cosecha de IJ₃ que llegan hasta los 150 000 por larva del 5^{to} instar, en los CREE del MINAZ, aspecto que en *S. frugiperda* llegó a 85 850 IJ₃, 1.74 veces inferior. O sea, por cada larva del V instar de *G. mellonella* se

necesitan 2 larvas de *Spodoptera*, pero al referir las tecnologías de cría artificial con dietas naturales citadas por Armas y Ayala (1990); Armas y Ayala (1993); Gómez *et al.* (1994) y Chacón *et al.* (2009) en diferentes variantes, se obtienen cantidades suficientes para llevar a cabo esta tecnología y obtener con dos larvas del V instar de *S. frugiperda* una cantidad de IJ₃ superior a la que se obtiene actualmente de una larva de *G. mellonella*.

Otro aspecto a tener en cuenta es que las larvas de *Spodoptera* se pueden montar en puentes al 6^{to} día con esos rendimientos, mientras que *Galleria* necesita entre 11 y 14 días, duplicando el tiempo, lo que hace más factible esta tecnología.

El ciclo de vida de *G. mellonella* oscila según la temperatura entre 6 y 7 semanas, su estado larval puede sobrepasar el mes, para alcanzar el V instar, mientras que para *S. frugiperda* alcanzar el V instar de desarrollo larval media entre 13 y 14 días en varios alimentos como *S. halepense*, *Z. mays* y *S. bicolor* respectivamente (Rojas 2000), entre 14 y 21 menos de lo que se necesita para *G. mellonella*, lo que posibilita este lepidóptero pueda potenciarse en su empleo para la reproducción de nematodos entomopatógenos.

Estos resultados novedosos brindan la posibilidad de la aplicación a escala de CREE del MINAGRI, dónde cultivan *S. frugiperda* por la tecnología referida por Armas y Ayala (1990); Armas y Ayala (1993) y Gómez *et al.* (1994), que permite además realizar reproducciones rusticas de este agente de control biológico en localidades alejadas de los CREEs y propiciar el medio biológico de nematodos entomopatógenos a todas las localidades por sus ventajas de causar daño a más de 100 especies de insecto plagas (Alatorre y Hernández, 2000).

5. Conclusiones

1. Todos los instares larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) fueron susceptibles a los NEPs *Heterorhabditis indica* Cepa P₂M.
2. El instar larval más susceptible de *S. frugiperda* fue el II instar en el cual se obtuvo el 100% de mortalidad a las 72 horas en todas las dosis superiores a 60 n/larva.
3. El instar más efectivo para la reproducción de los NEPs fue el V instar larval de *S. frugiperda* sobre el cual hubo un incremento de 47.194 y 171.7 veces para las dosis de inoculación de 250 n/larva y 500 n/larvas respectivamente.
4. Las larvas de los instares III al V de *S. frugiperda* se momifican a partir del 5 día de inoculadas, lo que permite que puedan montarse en puente al sexto día post-inoculación
5. Las larvas de *S. frugiperda* en su último instar supero en peso a las larvas de *G. mellonella.*, no produjo más nematodos, pero puede emplearse como hospedante de los nematodos en producciones masivas.

6. Recomendaciones.

1. Emplear larvas del V instar de *S. frugiperda* en la producción rústica de NEPs.
2. Utilizar una dosis de inoculación de 500 n/larvas para inocular las larvas de *S. frugiperda*.
3. Montar en puente las larvas de *S. frugiperda* cuando estas se momifiquen (a partir del 6^{to} día de post-inoculadas).

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Akhurst, R. J. y N. E. Boemare. (1990). Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. Pp 75-90. En *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H.K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton –Ann Arbor- Boston.
2. Alatorre-Rosas, R. y M. A. Hernández. (2000). The use of *Heterorhabditis* for white group control. *Nematropica* 30(2): 113. (Abstr.).Alves, S. (1986).Controle microbiano de insectos. Editora Manale. Sao Paulo. Brazil. p 210-221.
3. Armas, J.L.y J.L.Ayala. 1990. Metodología para la cría continua de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) en dieta artificial. *Rev. Centro Agrícola* 17 (2):78-85.
4. Armas, J.L.y J.L.Ayala; Numancia N.Estevez y Rosa E.Gómez. 1993. Manual para la reproducción y empleo de *Telenomus* sp., Parasitoide de huevos de la palomilla del maiz, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). Unidad Provincial de lucha biológica. MINAGRI. Sancti Spiritus.
5. Arteaga, E.; E. Fernández, T. Vázquez. (1994). Los nematodos entomopatógenos. Situación actual y perspectivas. III Simposio Internacional de Zoología. Ciudad de la Habana.
6. Babb, M. E. C. (2006). Evaluación de la susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a BAZAM® (*Beauveria bassiana*). Pp. 2-3. En Proyecto especial como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de licenciatura, Zamorano, Honduras.
7. Baghdigian S.;Marie Hélene Boyer-Giglio; J.O. Thaler; G. Bonnot and N. Boemare. 1993. Bacteriocinogenesis in cell of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: *Enterobacteriaceae* associated with entomopathogenic nematodes. *Rev. Biol Cell*(1993)79. Elsevier, París. p 177-185.
8. Batalla Mayoral, Jessica; Adriana Inés Hernández y N. Chavarria Hernández. 2008. Optimización de un medio complejo para la producción del nematodo entomopatógeno, *Steinernema Zeltia*, en cultivo sumergido – Analisis de superficie de respuesta. Centro de los Alimentos, ICAP-UAEH, Mexico. En sitio Web:www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertoallarta03/.../CII-66.pdf, Consultado: 25 mayo de 2010.

9. Bedding, R.A., 1993. An overview of insect- parasitic and entomopathogenic nematodes. Pp. 1-10. En *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. R. Bedding; R. Akhurst; H. Kaya (Eds.) CSIRO, East Melbourne, Australia.
10. Begley, J.W. 1990. Efficacy against insects in habitats other than soil. In: *Entomopathogenic Nematodes in biological control*. R. Gaugler; and H.K. Kaya (Eds) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp 215- 231
11. Biología S. Frugiperda. En sitio Web:
http://compendium.bayercropscience.com/BAYER/CropScience/CropCompendium/BCS/CropComp.nsf/id/EN_Spodoptera_frugiperda?open&ccm=200010
12. Caridad González; Hernández D; Rodríguez J. L. 2000. Primer Informe de Tamarixia
13. Castro, M. 2004. Empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) en organopónicos y huertos intensivos como contribución al Manejo Integrado de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae). Trabajo de Diploma, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. 40p.
14. Cave, R.D. (1994). ¿Es viable el control biológico de un vector de geminivirus como *Bemisia tabaci*?. *Manejo Integrado de Plagas*. No 34, p. 18-22.
15. Certis. (2003). Productos a base de nematodos insecticidas para la protección del cultivo. En página Web: www.certis.com.mx/nematode.html. (Consultado 05/14/10)
16. Chacón Castro, Yerlin; C. Rojas G.; C. V. Cedeño y V. Villalba Velásquez. 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en Marcha*, Vol. 22, N.º 4, Octubre-Diciembre 2009, P. 28-37.
17. Ciomperlik, M.A.; Goolsby, J.A.; Poprawski, T.; Wendel, L.E. (1998). Biological control based-IPM of silverleaf whitefly in annual row crops. In.: *International workshop on Bemisia and Geminiviruses*. Memoirs. San Juan, Puerto Rico. June 7-12. p. L-77.
18. Clarke, S. 1978. *Elementos de Ecología*. Edit. Pueblo y Educación, La Habana, p – 159.
19. Dill. J. F.; D. T. Handley 1996 Fall army Word. *Spodoptera frugiperda*, (J. E. Smith) *Managen insect pest of sweet, corn*. Vegetable IPM Facts heet 4010. Bulletin 5101.
20. Doucet, M. M. A. y A. Giayetto. (1994). Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (*Heterorhabditidae*: Nematoda). *Nematol. Medit.* 22: 171-178.

21. Ehlers R. U. 1998. Entomopathogenic nematodes. Save biocontrol agents por sustainable systems. Rev. Phitoprotection. Suppl.79. p 94-113.
22. Fall Armyworm....<http://www.ento.okstate.edu/ddd/insects/fallarmyworm.htm>
23. Fisher-le Saux Marion, H. Mauléon, P. Constant, B. Brunel and N. Boemare. 1998. PCR-Ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean Region in relation to the taxonomy and geography distribution of their nematodes hosts. Rev. Applied Environmental Microbiology 64(11).Nov. P 4246-4254.
24. Forschier, B. T.; J. N. All and W.A. Garrner. 1990. *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. *J. Invert. Pathol.* 55: 375-379.
25. Franco, F., Rosario Pedroso, A. Noa, I. Castañeda, C. Ríos, I. Aredondo y A. Chacón. 2004. lista oficial de plantas. Material complementario para la botanica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. 17p.
26. Gaugler, R. 2004. Nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/nematodos.html> (Consultado diciembre, 2004) Poinar, G.O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae: En: Entomopathogenic nematodes in Biological Control. R Gaugler and H.R. Kaya. (Eds). Boca Ratón. pp 23 – 61.
27. Georgis, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Sci. Technol.* (2): 83-99.
28. Georgis, R. and S.A. Manwiler. 1994. Entomopathogenic nematodes. A developing biological control technology. In: agricultural Zoology Reviews.Ed. K.Evans.p:63 – 94.
29. Gómez S.J.; J.Rojas R.; Neida Aragón G.; A. Pérez R.;Cecilia Valdés; Irma Fernández V.; O. León N.; F. Medina; Alfa Queiro; Sommy Fernández A. y U. Alvarez H. 1994. Resumen de la tecnología de Producción y Aplicación de los parasitoides contra *Spodoptera frugipeda*. IX Forum Nacional de Ciencias y Técnica.
30. Gómez Sousa J. 1981 Control Biológico 172 pp. Edit. Pueblo y Educación, La Habana.
31. Grewal, P.S.1996. A third level of specificity of association between entomopathogenic nematodes and bacteria. Proceedings of THIRD. Int. Nemat. Congress, Guadeloupe.

32. Grillo, H. 2004. Comunicación personal sobre identificación de insectos entomopatógenos.
33. Head, J., K. F. A. Walters y S. Langton. (2000). The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *Biocontrol*. 45(3): 345-353.
34. Heinrichs, E. A; J. E. Foster y J. Molina. (2004). Insectos plaga del maíz en Norteamérica. Extraído el 20 de noviembre, 2009, de <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/MaizeSP.htm>. (Consultado 19/12/09)
35. Hernández Yildé; C. Murguido; E. Pena y Ana Elizondo. 2000. *Diaphorina citri* Kuwayama. Una nueva plaga en Cuba. *Forum Tecnológico sobre Manejo Integrado de Plagas*. La Habana, INISAV. p-80.
<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do;jsessionid=11C92B67AC1F594BC9ABE5BBD36C79EF?f=2009/CU/CU0901.xml;CU2009100378> (Consultado 02/04/10)
36. Inbio. 2004. Lista de especies en Jerarquía Taxonómica. En sitio web: <http://www.Inbio.Ac.cv/bims/BIMS.html>. [Consultado 04/11/10].
37. Ishibashi, N. and E. Kondo. 1990. Behaviour of infective juveniles. Pp 139-153. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds.). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor-Boston
38. Kakouli-Duarte, T., L. Labuschagne and N. G. M. Hague (1997) Biological control of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida). *Ann. Appl. Biol.* 131: 11–27.
39. Kaya, H. K. 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. pP 23-302. En *Biological Control in Agricultural IPM Systems*. M. A. Hoy; D. C. Herzog (Eds:) Academic Press, New York.
40. Kaya, H. K. 1996. Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes. En *Biological Pest Control in Systems of integrated Pest Mangement*. Proc. Int. Symp.on “Theuse biological control agents under integrated pest management”. (Food and Fertilizer Techonology Center for the Asian and Pacific Región.), Taipei, Taiwan. (FFTC) Serie 47: 1-13.

41. Kaya, H. K. and T. M. Burlando. (1989). Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 53(2): 164-168.
42. Kaya, H. K.; R. A. Bedding; R. J. Akhurst. 1993. An overview of insect- parasitic and entomopathogenic nematodes. Pp. 1-10. En *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. R. Bedding; R. Akhurst; H. Kaya (Eds.) CSIRO, East Melbourne, Australia.
43. Kaya, H. y Patricia Stock. 1997. Techniques in insect nematology. 1999. p 281-324. In: L. Lacey (ed), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
44. Kaya, H. y R. Gaugler. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38:181-206.
45. King, A. B. and J. L. Saunders 1984 *Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central*. Administración de desarrollo Extranjero. Londres. 182 p.
46. Klein, M. G. (1990) Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (R. Gaugler and H. K. Kaya eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 195–214.
47. Lewis, E. E; R. Gaugler and R. Harrison. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae*) to host volatile cues. *Can. J. Zool.* 71:765-769.
48. Lisansky, S.G. 1993. The market for biopesticides. En *opportunities for molecular biology in Crop production Int. Symposium 27-29 sep., Churchill College. Cambridge, united Kingdon.*
49. Madrigal Cardeño, J.A. Breve reseña sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Lepidoptera: Noctuidae* plaga de importancia económica en los cultivos de algodón, maíz y otros. *Sociedad Colombiana de Entomología, Espinal (Colombia) Seminario Complejo Spodoptera, Espinal (Colombia), 25 Abr 1980. 36 pp.*
50. Marengo, R. 1988. Parasitoides del gusano cogollero *S. frugiperda* (Smith) en maíz, en la zona atlántica de Costa Rica. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 2-9 pp.*
51. Marrero, P. Maria. 2003. Nematodos Entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Plutella xylostella* (Linnaeus.) y *Heliothis*

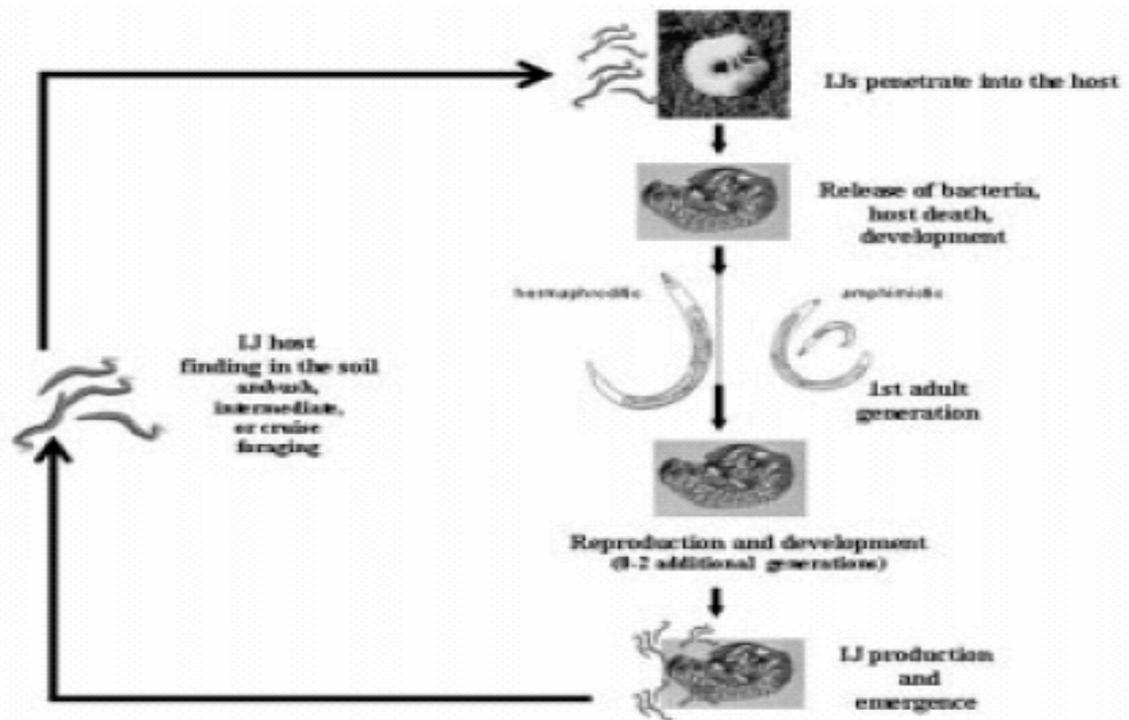
- virescens (Fabricius). Tesis presentada para aspirar al título de Master en Ciencias en Agricultura Sostenible. CIAP. 54p.
52. Milstead, J. E. and G. O. Poinar. 1978. A new entomogenous nematode for pest management systems. Calif. Agric. 32(3): 12-14.
 53. MINAG 2003. Prioridades de la Ciencia y la Innovación Agraria. Dirección de Ciencia y Técnica. p - 6.
 54. Murillo, A. 1991. Distribución, importancia y manejo del Complejo Spodotera en Colombia, en Spodoptera frugiperda (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Memorias. Editado por Seminario Organizado por el Comité Interinstitucional de Sorgo (CIS) y la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) p 15-23.
 55. Nicaragua. 2006. MINI-SERIE "MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS" N° 4. La lucha biológica contra las plagas. En sitio web:
<http://www.insectariumvirtual.com/termiteo/nicaragua/DOCUMENTOS%20DE%20IN%20TERES/MIP%204.htm>. [Consultado el 21/04/10)].
 56. Nickle, W. R. and W. W. Cantelo (1991) Control of a mushroom infesting fly, *Lycoriella mali*, with *Steinernema feltiae*. J. Nematol. 23: 145–147.
 57. Poinar, G. O. Jr. 1990. Biology and taxonomy. Pp 23-61. En Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. R. Gaugler, H. K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton-Ann Arbor-Boston.
 58. Poinar, G. O.; Jr. 1989. Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). Rev. Nematol. 12(4): 423-428.
 59. Pozo, Velázquez, E.; Diágnara López R. Y Yaili Martínez G. 2000. Aislamiento de nematodos entomopatógenos de la Estación Experimental de la UCLV y el cálculo de la DL-50 sobre *Galleria mellonella* (L.)
 60. Quintero, Maria Paulina. 2003. Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (RHABDITIDA) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (BLANCHARD) (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga. UNIVERSIDAD DEL VALLE. FACULTAD DE CIENCIAS. PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA. SANTIAGO DE CALI.

61. Richardson, P. N. (1987) Susceptibility of mushroom pest to the insect parasite nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *Ann. Appl. Biol.* 111: 433–438.
62. Rodríguez Mayra G. y Carolina Rosales. 2007. Nematodos entomopatógenos: Generalidades. Aspectos de su reproducción y uso como agentes de control biológico en programas MIP. Curso “Manejo Integrado de Plagas”, para especialistas venezolanos del MAT. CENSA. Octubre 16 al 31 del 2007.
63. Rodríguez, M., Universidad de Sancti Spíritus, Meléndrez, J.F., Universidad de Sancti Spíritus, Calero, A., Universidad de Sancti Spíritus, Viera, R., Universidad de Sancti Spíritus, Plasencia, R., Universidad de Sancti Spíritus, (2008). Efectividad de *Heterorhabditis indica* en el control biológico del tetuán del boniato (*Cylas formicarius* var. *elegantulus* Fab.) en Sancti Spíritus.
64. Rojas, J. 2000. Estudios bioecológicos y control de *Spodoptera frugiperda*. Tesis doctoral. Universidad Central de las Villas, 97 pp.
65. Rojas, J. 2000a. Biología de *Telenomus* sp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Centro Agrícola* 32 (4): 90, octubre-diciembre, 2000.
66. Rosales A. L. C. y Suarez H. Z. (1998). Nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín de Entomología Venezolana* 13: 123–140.
67. Rovesti, L., E. W. Heinzpeter, F. Tagliente y K. V. Deseo. (1989). Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 34(4): 462-476.
68. Ruiz González, Yanetsy. 2005. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) una alternativa para la multiplicación de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.). Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. 74 pp.
69. Sánchez, L. (2003). *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. 122 p.
70. Simons, W. R. (1981) Biological control of *Otiorynchus sulcatus* with heterorhabditid nematodes in the greenhouse. *Neth. J. Pl. Pathol.* 87: 149.

71. Timper, P. and H. K. Kaya. 1989. Role of the second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 54(3): 314-321.
72. Valdés Herrera R.; E. Moya Pérez; M. Castro Vázquez; E. Pozo Velázquez y Marlen Cárdenas Morales. 2005. Empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) como contribución al Manejo Integrado de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en el cultivo del pepino en sistemas de organopónicos. *Centro Agrícola* 32(4):47-53, octubre-diciembre, 2005.
73. Valdés, R. (2003). Umbral económico de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en pepino (*Cucumis sativus* L.) y lucha biológica con el empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) en organopónicos. Trabajo de Diploma no publicado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba
74. Vázquez, L. 2003. Manejo Integrado de Plagas. Preguntas y respuestas para extensionistas y agricultores. INISAV. Ministerio de la Agricultura. La Habana. Cuba. 566p.
75. Waage, J. K (1997), *Biopesticides at the Crossroad: MIP Products or Chemical Clones*, pp., 11-19. In: *Microbial Insecticides: Novelty or Necessity*, Symposium Proceedings No. 68, British Crop Protection Council, Evans, H. (ed.)
76. Womersley, C. Z. 1990. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. Pp 117-137. En *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds). CRC Press. Boca Raton-Ann Arbor- Boston.
77. Woodring Jennifer L., y H. Kaya. (1988). *Stenernema* and *Heterorhabditis* nematodes: A hand handbook of biology and Techniques. *Southerncoopers Bull* (331): 1-30 p.
78. Wout, W. M. 1984. Nematode parasites of lepidopterans. Pp 655-698. En *Plant and Insect nematodes*. (Ed: Nickle, . W. R.) Marcel Dekker, New York, Ny. Wright et al., 1993;
79. Zimmeman, R. J. y W. S. Cranshaw. (1990). Compatibility of thee entomogenous nematodes (*Rhabditid*) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J. Econ. Entomol.* 83(1): 97-100.

8. Anexos

#1



Ciclo General de los Nematodos Entomopat6genos

Figura tomada de Hazir et al., 2003

#2



Larva de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)