



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



Trabajo de Diploma
Trabajo de Diploma

***Heterorhabditis indica*, una alternativa para el
control biológico de *Boophilus microplus***

Autora: Elena Carvajal Ciomina

Tutores: Ing. Aliany Cuevas Abreu

Dr. C. Edilberto Pozo Velázquez

2012

“AÑO 54 DE LA REVOLUCIÓN”

Pensamiento



Pensamiento

El único camino abierto a la prosperidad, constante y fácil, es el de conocer, cultivar y aprovechar los elementos inagotables de la Naturaleza.

José Martí

Agradecimientos



Agradecimientos

La autora desea agradecer, de corazón, a todas las personas que brindaron el apoyo y la ayuda necesaria en todo este tiempo.

A mis padres, a mi abuela y a mi tía, y a toda mi familia, quienes me han apoyado en todo momento.

A Nelvy, mi compañero, por su comprensión y apoyo diarios.

A mis tutores Edilberto Pozo Velázquez y Aliany Cuevas por su ayuda constante y el tiempo dedicado a la culminación este trabajo.

A la Ing. Marlen Cárdenas, técnica del laboratorio del CIAG de la UCLV por su infinita ayuda.

A los compañeros del departamento de Parasitología del CBQ, especialmente a Héctor Serrano, Alcides Morales, Alfredo Meneses y Sergio Sifontes, y a todo aquel que brindó su granito de arena para la realización de este trabajo.

A mis profesores por enseñarme y hacer de mi lo que hoy soy.

A mis compañeros de aula, especialmente a Rocmira Pérez Nicado por su apoyo durante la carrera.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS,

Elena Carvajal Ciomina.

Dedicatoria



Dedicatoria

A mi familia, en particular a mi hermanita, personas importantes en mi vida.

Resumen



Resumen

Se estudió la susceptibilidad de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini), plaga del ganado vacuno, en los estados larval y adulto, frente al nematodo *Heterorhabditis indica* Poinar a nivel de laboratorio. Se utilizó la especie *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como hospedante para la reproducción masiva “*in vivo*” de nematodos. Para los experimentos en *Boophilus microplus*, en su estadio larval, se analizó el porcentaje de eclosión, y se aplicaron concentraciones de 100, 200 y 400 nematodos/garrapata con cinco réplicas por tratamiento. Para el estado adulto se aplicaron concentraciones de 25, 50, 75 y 100 nematodos/garrapata con diez réplicas por tratamiento. Se calculó el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento, y el porcentaje de ovoposición para adultas. Para *B. microplus* (estado larval), los resultados arrojaron un 60% de mortalidad para el tratamiento de 100 nematodos/garrapata, mientras que para 400 nematodos/garrapata fue de un 80%. En el estado adulto, para la concentración de 25 nematodos/garrapata a las 168 horas, la mortalidad resultó ser del 90%, mientras que para 100 nematodos/garrapata fue de un 100%, con un porcentaje de ovoposición de 50% para ambos tratamientos. La CL_{50} para larvas fue de 62.5 ij_3 y para adultos de 6,5 ij_3 . Los resultados indican una efectividad para el control de *B. microplus*, por lo que es posible el uso del nematodo *H. indica* para el control biológico de la garrapata *B. microplus*.

Palabras clave: *Boophilus microplus*, CL_{50} , control biológico, *Heterorhabditis indica*

Abstract



Abstract

The susceptibility of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) pest of the bovine livestock, in the larval and mature states, was studied, front of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* Poinar at laboratory level. The species *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) was used as host for the massive reproduction "in vivo" of nematodes. For the experiments in *B. microplus*, in their larval stage the percentage of appearance was analyzed, and concentrations of 100, 200 and 400 nematodes/tick were applied with five replicas by treatment. For the mature state concentrations of 25, 50, 75 and 100 nematodes/tick were applied with ten replicas by treatment. The percentage of mortality was calculated in each treatment, and the ovoposition percentage for mature. For *B. microplus* (larval stage), the results threw 60% of mortality for the treatment of 100 nematodes/tick, while it stops 400 nematodes/tick it was of 80%. In the mature state, for the concentration of 25 nematodes/tick at the 168 hours, the mortality turned out to be of 90%, when used 100 nematodes/tick it was of 100%, with a percentage of ovoposition of 50% for both treatments. The CL_{50} for larvae was of 62.5 ij3 and for adults of 6,5 ij3. The results indicate an effectiveness for the control of *B. microplus*, for what is possible the use of the nematode *H. indica* for the biological control of the tick *B. microplus*.

Keywords: *Boophilus microplus*, CL_{50} , biological control, *Heterorhabditis indica*

Índice



Pensamiento

Agradecimientos

Dedicatoria

Resumen

Abstract

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	4
2.1. Garrapatas	4
2.1.1. Sistemática y características generales de <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini).	4
2.1.2. Distribución e importancia.	5
2.1.3. Mecanismos de infección.	6
2.1.4. Ciclo de vida.....	6
2.1.5. Métodos de control más utilizados.	7
2.2. Nemátodos entomopatógenos.	9
2.2.1. Sistemática y características generales de <i>Heterorhabditis indica</i> (Poinar)..	9
2.2.2. Ciclo de vida.....	10
2.2.3. Asociación nematodo- bacteria.	11
2.2.4. Mecanismos de supervivencia.....	12
2.2.5. Mecanismos de infección.	13
2.2.6 Diversidad de hospedantes.	14
2.2.7 Reproducción.	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
3.1. Susceptibilidad de larvas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos....	17
3.2.. Susceptibilidad de adultas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos.	18
3.3. Determinación de la CL ₅₀ de nematodos entomopatógenos por larvas y adultas de <i>B. microplus</i>	18
3.4. Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de <i>B. microplus</i>	19

4. RESULTADOS.....	20
3.1. Susceptibilidad de larvas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos....	20
3.2.. Susceptibilidad de adultas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos.	21
3.3. Determinación de la CL ₅₀ de nematodos entomopatógenos por larvas y adultas de <i>B. microplus</i>	22
3.4. Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de <i>B. microplus</i>	24
5. DISCUSIÓN.....	26
3.1. Susceptibilidad de larvas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos....	26
3.2.. Susceptibilidad de adultas de <i>Boophilus microplus</i> a nematodos entomopatógenos.	27
3.3. Determinación de la CL ₅₀ de nematodos entomopatógenos por larvas y adultas de <i>B. microplus</i>	30
3.4. Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de <i>B. microplus</i>	31
6. CONCLUSIONES.....	32
7. RECOMENDACIONES.....	33
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

Introducción



1. INTRODUCCIÓN.

La ganadería tropical cubana posee hemoparásitos, sobre todo en el ganado bovino, que constituyen uno de los principales problemas, con graves consecuencias económicas, provocando pérdidas cuantiosas en la producción de leche, disminuyendo considerablemente la conversión alimentaria y la ganancia de peso diaria (Redondo *et al* , 1999).

La garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), figura como uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica a escala mundial, por las pérdidas que ocasiona en la producción pecuaria (Grisi *et al.*, 2002); problemática que se acentúa en la cría del ganado vacuno, sobre todo, debido a esta especie es un componente fundamental del ciclo biológico de la garrapata, al constituir su hospedante por excelencia, aunque ocasionalmente puede parasitar tanto el ganado equino como el ovino. (Gonzales, 1974). En Cuba, las pérdidas económicas, causadas por la acción patógena de las garrapatas, se estiman en 8 millones de dolares (Cordovés *et al.*, (1980).

Actualmente, es común utilizar productos químicos para el tratamiento de las diferentes enfermedades y parasitismo del ganado bovino. Sin embargo, es bien sabido que su aplicación frecuente puede generar resistencia en los organismos que se combaten (Panella *et al.* 1997 y Kemp *et al.* 1998), además de que producen efectos colaterales, los cuales el animal deberá enfrentar junto con la enfermedad (Thullner, 1997).

En base a lo anteriormente expuesto, se hace cada vez más necesaria la búsqueda de alternativas eficientes que, a la vez de efectivas, no sean agresivas para la salud animal y humana, así como para el ambiente.

Se han estudiado varias alternativas no químicas para el control de garrapatas, de las cuales algunas se han puesto en práctica. De ellas se pueden citar como ejemplo: bacterias (*Bacillus thuringiensis*), hongos (*Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisopliae*.) y nematodos entomopatógenos.

De los agentes de control biológico mencionados uno de los menos utilizados en Cuba son los nematodos entomopatógenos. Estos agentes pueden llegar a controlar un gran número de plagas lo que demuestra su gran eficacia para ser utilizados en esta lucha. (Mannion y Jansson, 1993; Sulistyanto y Ehlers, 1996; Ehlers y Peter, 1996).

Es necesario por ello realizar estudios dirigidos a conocer el efecto de estos biorreguladores frente a *B. microplus*, uno de los principales ectoparásitos que afecta de manera notable al ganado vacuno, y por tanto a la economía del país.

Por lo que se traza la siguiente Hipótesis:

Si *Heterorhabditis indica* (Poinar) ejerce un control sobre la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini), entonces se pudiera establecer una estrategia para su control biológico.

Para dar cumplimiento a la hipótesis se trazó el siguiente Objetivo general:

Objetivo general:

Determinar la efectividad de *Heterorhabditis indica* en el control biológico de *Boophilus microplus* (Canestrini), y las concentraciones letales a emplear para su control.

Objetivos específicos:

1. Determinar la susceptibilidad de larvas y adultos de *B. microplus* a *H. indica*, en condiciones de laboratorio
2. Determinar los cambios en los parámetros biológicos de *B. microplus*, en tratamientos con *H. indica*
3. Determinar las Concentraciones Letales de *H. indica*, sobre *B. microplus*

Revisión Bibliográfica



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Garrapatas

Las garrapatas son ácaros cosmopolitas, ectoparásitos temporales de reptiles, aves o mamíferos, pertenecen a la Clase Arácnida del Orden Acarina. Por su tamaño resultan observables a simple vista. Las especies conocidas no alcanzan el millar, se dividen en dos familias: Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas).

2.1.1. Sistemática y características generales de *Boophilus microplus* (Canestrini).

Morfológicamente, las especies de la familia Ixodidae se caracterizan por poseer el cefalotórax y el abdomen fundidos en una sola región continua, desprovista de segmentación. El dimorfismo sexual es acentuado con un escudo pequeño y corto en hembras, larvas y ninfas, no sobrepasando la región media del cuerpo; mientras que en machos el escudo es largo y se extiende hasta la margen posterior. En las hembras se observan áreas porosas; hipostoma denticulado en la mayoría de los géneros.

Estudios moleculares y morfológicos recientes de los géneros *Rhipicephalus* (Koch, 1844) y *Boophilus* (Canestrini, 1887) indicaron que las cinco especies de *Boophilus* forman el género paraphyletico *Rhipicephalus*. Con base en esto, *Boophilus* es ubicado como un subgénero de *Rhipicephalus* y por lo anterior las cinco especies de *Boophilus* deben ser citadas así: *Rhipicephalus* (*Boophilus*), (Murrell & Barker, 2003), sin embargo la sinonimia de *Boophilus* con *Rhipicephalus* no da lugar a la pérdida del género *Boophilus* (Barker y Murrell, 2004). Estos cambios en la taxonomía del género se deben a estudios moleculares de partes del genoma de las especies del género, sin embargo a pesar de la cercanía genética entre ambos géneros, las diferencias tanto morfológicas como biológicas (en especial sus ciclos de vida), son evidentes. Esta nueva ubicación taxonómica del género *Boophilus* no es aceptada por algunos taxónomos como Caeiro (2006) en Portugal,

quien considera que los caracteres morfológicos que presentan los ixódidos definen muy bien los géneros. Según el autor la ubicación de *Boophilus* como subgénero del género *Rhipicephalus*, es un resultado tímidamente presentado que no es aceptado por varias razones: desde el punto de vista biológico las especies del género *Boophilus* completan su ciclo vital en un sólo hospedante, mientras que las especies del género *Rhipicephalus* lo completan en tres hospedantes, con excepción para *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus evertsi* que lo realizan en dos hospedantes.

Boophilus microplus

Es un ectoparásito de un solo hospedante y hábitos hematófagos estrictos, (Encinas *et al.*, 1999).

Es una garrapata no ornamentada y carece de festones en su borde posterior. El macho mide 1,5 a 2,3 mm de largo y la hembra repleta de sangre llega a tener 9 a 10 mm haciéndose globulosa y de un color verde oscuro azulado.

2.1.2. Distribución e importancia.

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles. La adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia, es la principal razón por la que producen grandes pérdidas económicas, sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que ellas transmiten.

El impacto económico negativo de *B. microplus* a la ganadería se debe a efectos directos e indirectos (Lima *et al.*, 2000). El efecto directo, es el resultado del daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos (Sutherst, 1983). El efecto indirecto está dado por los agentes etiológicos que transmiten (Cen *et al.*, 1998).

Constituye el principal transmisor biológico de agentes patógenos como: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. Los protozoos *B. bovis* y *B. bigemina* son transmitidos por la hembra a los huevos por vía transovárica. *B. bovis* es transmitido al ganado por las larvas infectadas y *B. bigemina* solamente es transmitida por ninfas y adultos (Guglielmone *et al.*, 2006). Constituye además un agente debilitador, que afecta la producción de leche, carnes y pieles, influyendo también en la presentación de abortos y crías muertas, lo que ocasiona gastos en divisas por concepto de compras de garrapaticidas y medicamentos.

2.1.3. Mecanismos de infección.

Las garrapatas están provistas de un aparato bucal especializado para la succión de sangre del huésped. Para ello se valen de una adaptación en los quelíceros, que les permite romper la piel, clavar el hipostoma y fijarse a los bordes de la herida.

Por este motivo, resulta una fijación muy sólida y difícil de deshacer. Al fijarse al cuerpo y succionar sangre, la garrapata segrega saliva que provoca irritación local, una afluencia más intensa de sangre impidiendo la coagulación de la misma en el lugar de la picadura. Esta secreción, de efecto tóxico origina una inflamación local que unida al canal de la picadura, causa dolores a los animales, lo que causa apatía en el hospedante (McKenzie, 1998).

2.1.4. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *B. microplus* se compone de dos fases (Basto *et al.*, 2006):

- ❖ Fase de vida libre o no parasitaria.
- ❖ Fase parasitaria o sobre el hospedante.

La garrapata pasa por 4 estados biológicos: huevo, larva, ninfa y adulto.

La infestación ocurre al encontrarse el hospedante en el pasto, donde está la larva activa, y por medio de geotropismo negativo, pasa de la vegetación al hospedante, al

ser atraída por la emanación de CO₂ del mismo, del que se sujeta a su paso entre la maleza (Solís, 1986).

La duración de vida en la fase larvaria en las hierbas es muy variable e importante cuando se pretende establecer algún programa de control, (Sutherst *et al.*, 1979).

Una vez que copula, se mantiene sobre el hospedante y se alimenta de sangre, hasta el momento en que se desprende para caer en la pradera, la hembra ovoposita y muere (Basto, 2006). Al emerger las larvas comienzan un nuevo ciclo, que dura aproximadamente 60 días. Los machos continúan alimentándose en el bovino o en el pasto. La fase parásita sobre el ganado es poco variable en su desarrollo en cuanto a tiempo (21-23 días), independiente de las condiciones climáticas imperantes, pero no así la fase de vida libre (Núñez *et al.*, 1982).

Durante la infestación se establece una relación muy estrecha con el hospedante bovino, la cual se lleva a cabo en los sitios donde se fija en la piel, a través de su aparato bucal. En ese lugar, las glándulas salivales de la garrapata secretan enzimas digestivas, inhibidores de la coagulación y otras sustancias activas que aseguran una relación inmunológica favorable al parásito (Núñez *et al.*, 1982).

2.1.5. Métodos de control más utilizados

Los métodos de lucha que actualmente se emplean contra la garrapata han variado poco en los últimos años, y en general no se han alcanzado resultados satisfactorios (De la Vega *et al.* 1985). El control de las garrapatas ha sido realizado mediante el uso de métodos químicos y no químicos. Los métodos químicos se basan en el uso intensivo de acaricidas sintéticos, los cuales se emplean en diferentes dosis y diferentes formas: concentrados, baños, sprays e inyecciones (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005; Patarroyo *et al.*, 2009). Las familias de ixodicidas que más se han empleado han sido los organoclorados, organofosforados,

piretroides, amidinas, fenilpirazolonas y lactonas macrocíclicas (Rosario y Hernández, 2001).

Los fitoplaguicidas más prominentes en los últimos años son los derivados del árbol del NIM (*Azadirachta indica*) los cuales han sido estudiados por la entomología y la fitoquímica (Mulla *et al.*, 1999; Huerta y Rodríguez, 1999).

La resistencia del *B. microplus*. a diferentes grupos químicos de acariciadas, constituye un problema. En Cuba la resistencia de las garrapatas a organosfosforados, ha alcanzado altos niveles (Villalba y Stendel, 1976). Algunos compuestos han tenido que ser retirados del mercado por su alta toxicidad y afectación al ambiente (Kemp *et al.* 1999).

Se han estudiado y puesto en práctica drogas que por acción sistémica actúan sobre el desarrollo del *B. microplus* afectando la evolución y la ovoposición. Otro grupo de sustancias sistémicas lo constituyen las avermectinas, que son lactosas microcíclicas de acción sistémica y de excelente efecto sobre los endo y ectoparásitos (Lombardero *et al.*, 1984).

La concientización de los efectos negativos de los ixodicidas en el ambiente ha motivado la búsqueda de métodos alternativos de control no químico (Kay & Kemp, 1994), donde se incluye la selección de razas de bovinos resistentes, vacunas antigarrapatas, y control biológico (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). Diferentes organismos vivos como las hormigas (*Pheidole megacephala*), bacterias (*Bacillus thuringiensis*), nematodos (*Heterorhabditis* sp., *Steinernema* sp.) y hongos entomopatógenos (*Beauveria* sp., *Metarhizium* sp.), han demostrado ser eficaces en el control de ectoparásitos de importancia veterinaria (Samish *et al.*, 2004)

2.2. Nematodos entomopatógenos

Los Nematodos (Nematoda) forman el mayor grupo de nematelmintos (*Nemathelminthes*), con unas 80.000 especies descritas en la bibliografía científica. Algunos investigadores plantean que existen realmente alrededor de un millón de especies.

Los nematodos entomopatógenos están ubicados taxonómicamente en el Orden Rhabditida

Suborden: Rhabditina

Superfamilia: Rhabditoidea (Woodring y Kaya (1988)).

Familia: Steinernematidae y Heterorhabditidae (Poinar (1976))

2.2.1. Sistemática y características generales de *Heterorhabditis* sp.

La familia Heterorhabditidae posee un solo género: *Heterorhabditis* sp. (Poinar, 1976). Este género se encuentra en asociación simbiótica con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, del género *Photorhabdus* (Boemare *et al.*, 1993). Son parásitos obligados de insectos que les confiere una considerable función como bioinsecticidas (Gaugler y Kaya, 1990).

El género *Heterorhabditis* ha surgido como candidato excelente de biocontrol alternativo para muchas especies patógenas al presentar características relevantes entre las que destacan:

- Posee un amplio rango de hospedantes (Gaugler, 1981, 1988; Doucet y Giayetto, 1994).
- Puede ser aplicado fácilmente con los equipos estándar (Reed *et al.*, 1986; Schmidt, 1998).
- Es factible la selección genética (Gaugler 1987; Glazer *et al.*, 1997)

-Es compatible con muchos insecticidas químicos (Forschler *et al.*, 1990; Hara y Kaya, 1993) y con otros agentes biorreguladores (Gothama *et al.*, 1995).

-Es ambientalmente seguro tanto para plantas, vertebrados y otros organismos (Poinar *et al.*, 1982; Poinar, 1989; Georgis y Hague, 1991; Boemare *et al.*, 1996).

2.2.2. Ciclo de vida.

Comprende seis estadios: huevo, cuatro estadios larvales o juveniles j_1 , j_2 , j_3 y j_4 (separados por mudas), y adulto.

La fase infectiva es el estado juvenil j_3 , 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.

Una vez que los juveniles infectivos de tercer estadio inician el ciclo de vida son capaces de localizar e invadir las larvas de una variedad de hospedantes favorables (Grewal y Georgis 1999). Todos los otros estadios de los nematodos existen solamente dentro del hospedero.

Los juveniles infectivos generalmente son envainados dentro de la cutícula del j_2 que no se desprendió de la misma al pasar al j_3 , 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 y Kaya, 1988).

Los juveniles durante la búsqueda de un nuevo hospedero en el suelo, no se alimentan, pero usan sus reservas de grasa. El metabolismo se reduce al mínimo, permitiendo a éstos sobrevivir por varias semanas a meses. Los nematodos de segundo estadio pierden la cutícula durante la penetración en un nuevo hospedero.

El ciclo descrito requiere de 12-15 días para *Heterorhabditis* sp. (Arteaga *et al.*, 1994). En pequeños insectos puede permitir solamente una generación.

2.2.3. Asociación nematodo- bacteria.

La asociación mutualista entre los nematodos y las bacterias, es única y altamente específica, que involucra una serie de procesos biológicos similares, que les confieren características de mayor virulencia. Los nematodos actúan como vectores y protegen a la bacteria de las condiciones ambientales del suelo y contribuyen significativamente en la patogénesis durante la liberación e invasión del hospedero. Mientras que las bacterias juegan un papel nutricional para el nematodo, al crear condiciones favorables para su desarrollo y reproducción y antibiosis contra otros organismos extraños.

Todos los *Heterorhabditis* spp. poseen a *Photorhabdus luminescens* como bacteria simbiote.

El tercer estadio infectivo juvenil de los nematodos, es quien conduce únicamente su bacteria simbiote (Akhurst, 1983; Bird y Akhurst, 1983). Estas bacterias se localizan en el esófago y en la porción ventricular del intestino en los estadios infectivos de *Heterorhabditis* sp. (Endo y Nickle, 1991), y la conducen dentro del hemocele de los insectos hospedantes (Boemare *et al.*, 1992).

Cuando los juveniles infectivos son atraídos a los hospedantes potenciales (Gaugler *et al.*, 1980) y mediante las amfidias detectan las huellas químicas (Perry, 1996); penetran, a través de las aberturas naturales, a diferentes larvas de insectos (Grewal y Georgis, 1999), emigran e invaden el hemocele, donde liberan las bacterias simbiotes, las cuales se multiplican en la hemolinfa rica en nutrimentos-trealosa (Friedman, 1978; Akhurst, 1982), probablemente a las cinco horas al entran al insecto (Dunphy y Thurston, 1990), rápidamente se propagan y matan al

hospedero en 48 horas, por septicemia letal, estableciendo condiciones favorables para el desarrollo de los nematodos (Akhurst, 1982; Akhurst y Dunphy, 1993).

Simões y Rosa (1996) mencionan que la familia Heterorhabditidae es patógena intra-hemocélica de insectos. La infección del hemocele de los hospedantes es un paso crítico durante la patogénesis, e involucra dos etapas: la invasión de la cavidad hemocélica y la evasión del nematodo infectivo de las reacciones del hospedante, permitiendo su establecimiento y nuevo desarrollo.

El complejo nematodo-bacteria muestra gran potencial como un agente de control biológico de insectos nocivos en ambientes crípticos (Klein, 1990). Esta asociación es de fundamental importancia, pues el género *Photorhabdus* es altamente patógeno para una diversidad de larvas de insectos (Dunphy y Webster, 1988).

2.2.4. Mecanismos de supervivencia

Debido a que estos nematodos son muy susceptibles a condiciones ambientales extremas han desarrollado los siguientes mecanismos de supervivencia (Ishibashi y Kondo, 1990).

- 1- Agregación: Ocurre comúnmente en muchas especies de nematodos y les permite protección contra la desecación y radicación solar (Wallace y Doncaster, 1964).
- 2- Inactividad: Si bien la movilidad constituye una ventaja en la búsqueda activa de los hospedantes la inactividad que pueden desarrollar se convierte en una ventaja para su supervivencia al reducir el uso de sus reservas energéticas. (Ishibashi y Kondo, 1986; Timper y Kaya, 1989).
- 3- Deshidratación: La pérdida de gran parte del contenido del agua de su organismo hasta el punto donde el metabolismo es completamente detenido dando como resultado un estado de suspensión total de la

animación denominado criptobiosis anhidrobiótica. (Womersley, 1990).

2.2.5. Mecanismos de infección

Para localizar al hospedante, los nematodos pertenecientes al género *Heterorhabditis* sp. migran activamente a través del suelo cuando la humedad relativa es alta (Ishibashi *et al.*, 1994), buscan activamente los hospedantes, siguiendo señales químicas emanadas por estos, y son más eficaces contra presas subterráneas sedentarias, (Gaugler *et al.*, 1989; Timper *et al.*, 1991).

Los nematodos penetran en el hospedante por las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y en el caso de *Heterorhabditis* también pueden penetrar directamente a través del tegumento intersegmental (Bedding y Molineux, 1982). En ácaros, penetran a través del ano o el poro genital de las hembras (Samish, 2000).

Bedding y Molyneux (1982) reportan que los juveniles infectivos de *Heterorhabditis* sp., se desprenden de la cutícula ante la presencia de un hospedante, y muestran un diente largo, anterior y terminal, el cual es usado para facilitar la ruptura de las membranas intersegmentarias, al raspar y romper la cutícula de los mismos.

Una vez que el nematodo se instala en el hemocele, libera las células de la bacteria a través del ano, las que proliferan y matan al hospedero a partir de las primeras 24 horas, modificando los tejidos y creando condiciones para permitir el desarrollo de los nematodos, que se alimentan tanto de los tejidos semidegradados como de las propias células bacterianas. Rápidamente ocurre el paso al cuarto estadio, que dará origen a adultos hermafrodita en *Heterorhabditis* sp. . 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 (Poinar, 1990; Kaya *et al.*, 1993).

2.2.6. Diversidad de hospedantes

Unos 16 órdenes de la clase Insecta son hospedantes de nematodos en condiciones de laboratorio y campo (Poinar, 1990; Doucet y Giayetto, 1994). Se encuentran con mayor frecuencia en Lepidoptera y luego en Coleoptera, Orthoptera, Diptera e Hymenoptera.

También se ha reportado susceptibilidad en ácaros del género *Boophilus* sp. (Georgis e Manweiler, 1994; Smart JR, 1995; Doucet *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998).

Debido a la bacteria asociada que mata rápidamente a los hospedantes, los nematodos no están adaptados al ciclo de vida del hospedero específico y son capaces de parasitar cientos de insectos plagas, este espectro de actividad, es más característico de un insecticida químico que de un biológico (Gaugler, 1988).

Sin embargo, y tal como señala Gaugler (1988) en la naturaleza, el rango de hospedantes puede ser restringido por las barreras ecológicas, el comportamiento del hospedante, y el número de nematodos entomopatógenos que existen para la infección.

2.2.7. Reproducción

Heterorhabditis sp. es de tipo hermafrodita proterándrica, o sea, los órganos masculinos y los espermatozoides se desarrollan antes que los órganos femeninos y los óvulos. En ellas existe un ovotestículo.

Para el uso comercial se realiza una reproducción masiva *in vivo*. En este tipo de reproducción se utilizan los insectos como pequeños reactores biológicos y generalmente se emplean larvas de *Galleria mellonella*, lepidóptero conocido como

polilla de la cera o de los apiarios, debido a su disponibilidad comercial (Woodring y Kaya, 1988). Tanto el inóculo como el producto del proceso son los estadios juveniles.

Materiales y Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), y el Laboratorio de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), ambos de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, ubicada en el municipio de Santa Clara, provincia Villa Clara, en los meses comprendidos desde septiembre del año 2011 a mayo de 2012.

Para llevar a cabo los experimentos se empleó el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* Poinar, la cepa P₂M, procedente de los CREE del Minaz de Villa Clara.

Para calcular las concentraciones de nematodos que se aplicaron en los experimentos de laboratorio se utilizó la fórmula ofrecida por Woodring and Kaya (1988):

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

donde: S: concentración (nematodos/mL) en la suspensión inicial.

N: número de nematodos por conteo (mínimo 2).

M: número 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 fórmula dada por los propios autores:

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

donde: A: volumen inicial de concentración conocida para ser diluida.

B: número de nematodos/mL en el volumen inicial para ser diluido.

C: volumen final (mL) de la nueva dilución.

D: número de nematodos/mL en el volumen final de la nueva dilución.

Como lo que se necesitaba era calcular el volumen final (C), se reajustó la fórmula de la manera siguiente:

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

Los nematodos Entomopatógenos se reprodujeron utilizando como hospedante la especie *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), con una inoculación de 200 a 250 nematodos por larva, debido a que esta concentración es la indicada por varios autores para obtener buenos rendimientos en los sistemas de reproducción de nematodos con el hospedante.

Las garrapatas *Boophilus microplus* (Canestrini) fueron colectadas de cueros de ganado provenientes del matadero “Chiqui Padron” y fueron colocados en viales de cristal con dimensiones de 1.5 cm de ancho por 4 cm de altura. Posteriormente fueron llevadas al Laboratorio de Parasitología del CBQ, donde fueron lavadas a chorro con agua destilada, y posteriormente secadas con papel de filtro, y colocadas en viales de cristal, previamente esterilizados.

3.1 Susceptibilidad de larvas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Los huevos, obtenidos a partir de las garrapatas seleccionadas para este ensayo, fueron colocados en viales con un tapón de algodón, para permitir el paso del aire y posterior eclosión larvaria, e incubados a una temperatura (T) de 28 (±1) °C y a una humedad relativa (HR) de 80 (±5) %. En los bioensayos se utilizaron larvas de 14 a 20 días de edad, debido a que este es el periodo donde las larvas culminan su desarrollo, y presentan mayor resistencia a los factores ambientales y a los métodos químicos de control.

Se calculó la concentración de nematodos para cada tratamiento. Se aplicaron 2 mL de suspensión con la concentración de nematodos determinada para cada tratamiento, sobre un papel de filtro en el plato inferior de una placa Petri y sobre el mismo, se colocó una larva, que posteriormente fue cubierta por otro papel de filtro. Las concentraciones aplicadas fueron 0, 100, 200 y 400 nematodos por tratamiento. El periodo de exposición fue de 72 horas, e incubados a T de $28 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ y HR de $80 (\pm 5) \%$.

3.2 Susceptibilidad de adultas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Los nematodos fueron inoculados a adultas de *B. microplus*. Se calculó la concentración de nematodos para cada tratamiento, y posteriormente, aplicó 1 mL de suspensión con la concentración de nematodos determinada para cada tratamiento, sobre un papel de filtro en el plato inferior de una placa Petri de 7 cm de diámetro. Posteriormente, se colocó una garrapata adulta por placa. Se aplicaron concentraciones de 25, 50, 75 y 100 nematodos por garrapata, por tratamiento. Al tratamiento control se le aplicó 1 mL de agua destilada estéril. La incubación se realizó a una T de $28 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ con $80 (\pm 5) \%$ de HR. Las garrapatas fueron expuestas a los nematodos por un periodo de 168 horas. La mortalidad de las garrapatas se registró diariamente mediante la observación de reflejos en las extremidades y de cambios en la coloración.

3.3 Determinación de la CL_{50} de nematodos entomopatógenos por larvas y adultas de *B. microplus*

Para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) de nematodos entomopatógenos sobre larvas y adultas de *B. microplus*, se tomaron los resultados del ensayo realizado de susceptibilidad de larvas (3.1), y se corrieron a través del programa Sigmoides denominado XLfit-2010, soportado sobre Microsoft Office 2010

y el Programa Microsoft Excel, que reúne en diferentes sigmoides las variantes de logaritmos y curvas que mejor se ajustan al proceso y a los datos obtenidos de las larvas muertas y vivas para cada tratamiento, utilizando esta operación matemática para resolver dicha concentración.

Estos datos se dispusieron en una curva con la ecuación de ajuste más cercana según el propio programa.

3.4 Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de *B. microplus*

Se analizó el porcentaje de ovoposición, el periodo de supervivencia, el peso de adultas en periodos de pre y post-ovoposición, el peso de los huevos al final del periodo de ovoposición o posterior a la muerte de la adulta.

Para el cálculo de la eficiencia en la ovoposición de las hembras tratadas con nematodos entomopatógenos, se ajustaron formulas expuestas por Thrusfield, 1997 procedentes de las directrices regulatorias europeas.

Este índice de eficiencia reproductiva expresado por como el índice de eficiencia ovoposicional (IEO). Todo ello ajustado a dos tratamientos, un control sin nematodos entomopatógenos y otro con las concentraciones siguientes 25, 50,75 y 100 nematodos/garrapata.

$$IEO = \frac{\text{Peso Huevos}}{\text{Peso Total}} \times 100$$

Resultados



4. RESULTADOS

4.1 Susceptibilidad de larvas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Las pruebas de susceptibilidad a los nematodos entomopatógenos arrojaron que la garrapata *B. microplus*, en su estadio larval, es susceptible a este agente de control biológico. La mortalidad fue superior al 50% a las 48 horas, para todos los tratamientos, con una proporción directa al aumento de la concentración de nematodos/larva. (Figura 1)

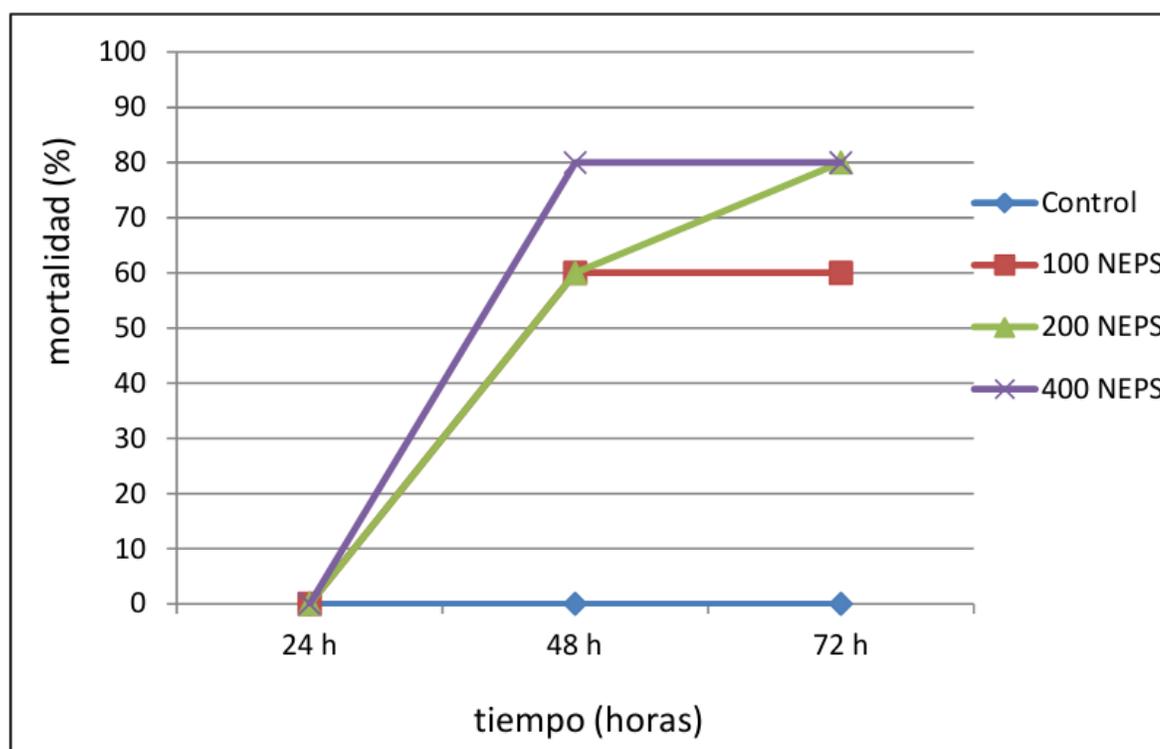


Figura 1: Porcentaje de mortalidad de larvas de *Boophilus microplus*, expuestas a diferentes concentraciones de infestivos juveniles (ij_3) de *Heterorhabditis indica*.

Al terminar el experimento la concentración de 100 ij_3 /larva tuvo un 60 % de mortalidad, 20 % por debajo de la mortalidad obtenida a las concentraciones de 200 y 400 ij_3 lo cual es un buen resultado para un medio biológico, en un tiempo relativamente corto.

4.2 Susceptibilidad de adultas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Las pruebas de susceptibilidad a los nematodos entomopatógenos de hembras adultas de la garrapata *B. microplus*, mostraron que las mismas son susceptibles a este agente de control biológico, y arrojaron que estos nematodos son capaces de provocar la muerte a antes de las 72 horas después de la aplicación de los mismos.

Se alcanzó un máximo de mortalidad a las 168 horas posteriores al tratamiento (Figura 2). Los tratamientos de 25 y 75 nematodos/garrapata presentaron una mortalidad de un 10% y un 20% respectivamente a las 24 horas posteriores a la aplicación. Se alcanzó una mortalidad superior al 90% al finalizar el periodo de estudio.

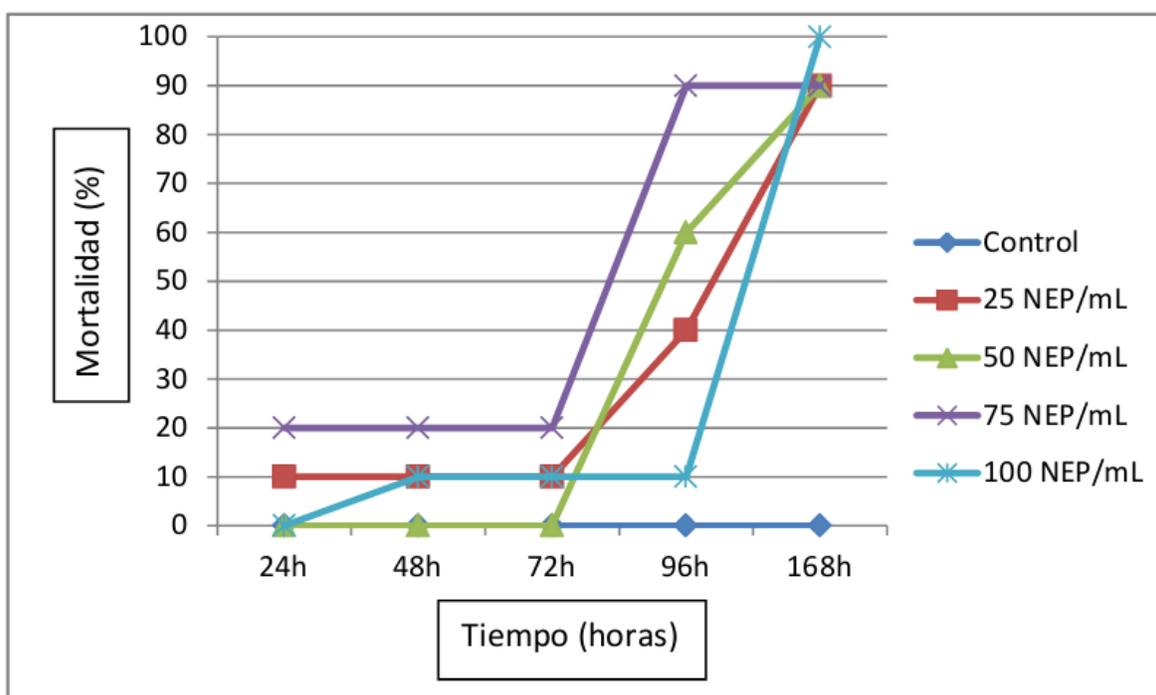


Figura 2: Porcentaje de mortalidad de adultas de *Boophilus microplus*, expuestas a diferentes concentraciones de infestivos juveniles (ij_3) de *Heterorhabditis indica*.

A partir de las 72 horas las hembras comenzaron a tener una muerte progresiva, y a las 96 horas comenzó una mortalidad general en todos los tratamientos que llegó a ser de 90 % para las concentraciones de 25 a 75 ij_3 , y un 100 % cuando fueron tratadas con 100 ij_3 .

4.3 Determinación de la CL_{50} de Nematodos entomopatógenos por larva y adulta de *B. microplus*

Cuando se ajustaron las curvas mediante el programa XLfit-2010, mostró que existió una relación proporcional entre el aumento de la concentración y la muerte en las larvas de *B. microplus*, y un cálculo de concentración letal media de 62.5 ij_3 por larvas para ocasionar la muerte al 50 % de la población de larvas de garrapatas (Figura 3).

Las curvas de regresión y el r^2 aportaron elementos de uniformidad en los resultados, aspecto muy importante, que acredita el resultado obtenido.

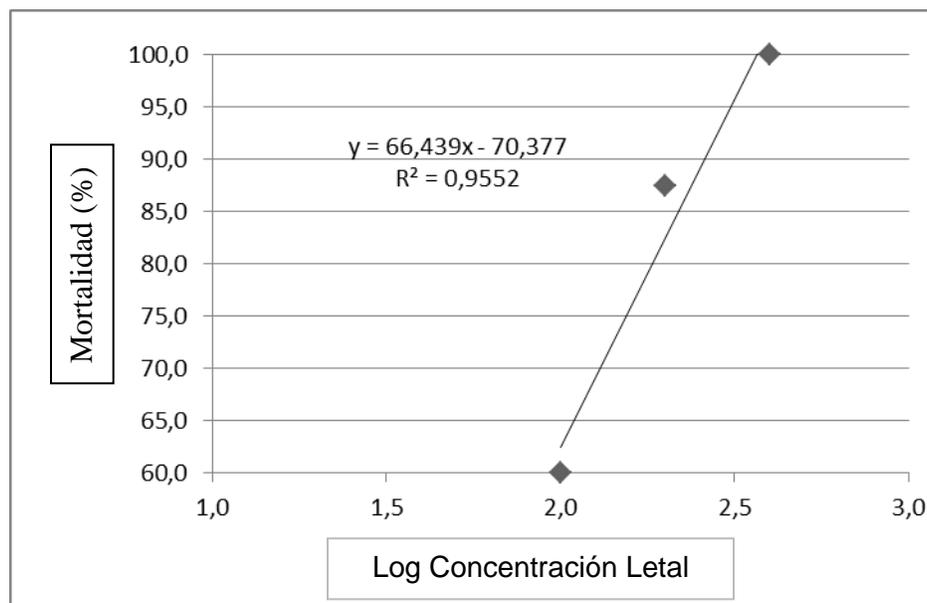


Figura 3: Concentración letal media (CL_{50}) de nematodos entomopatógenos/ larva de *B. microplus*

Al ajustarse las curvas mediante el programa XLfit-2010, para adultas de *B. microplus*, mostró que existió una relación proporcional entre el aumento de la concentración y la muerte en las adultas de *B. microplus*, y un cálculo de concentración letal media de 6.2 μg por adulta, para ocasionar la muerte de la población de adultas de garrapatas. (Figura 4)

En este resultado, se observaron características similares del r^2 , y las curvas de regresión, con respecto a las larvas, pero fueron más susceptibles las adultas a los nematodos entomopatógenos.

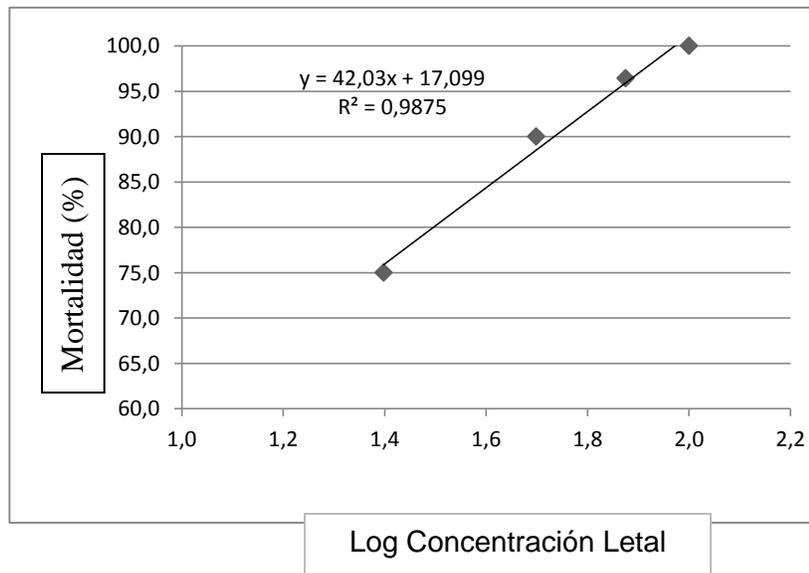


Figura 4: Concentración letal media (CL_{50}) de nematodos entomopatógenos/ adulta de *B. microplus*

4.4 Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de *B. microplus*

El control biológico con nematodos entomopatógenos tuvo un efecto reductor de un 50% en la ovoposición de la garrapata, en los tratamientos respecto al grupo control. Los valores más significativos correspondieron al tratamiento de 75 nematodos/garrapata con una reducción del 80%. (Figura 5)

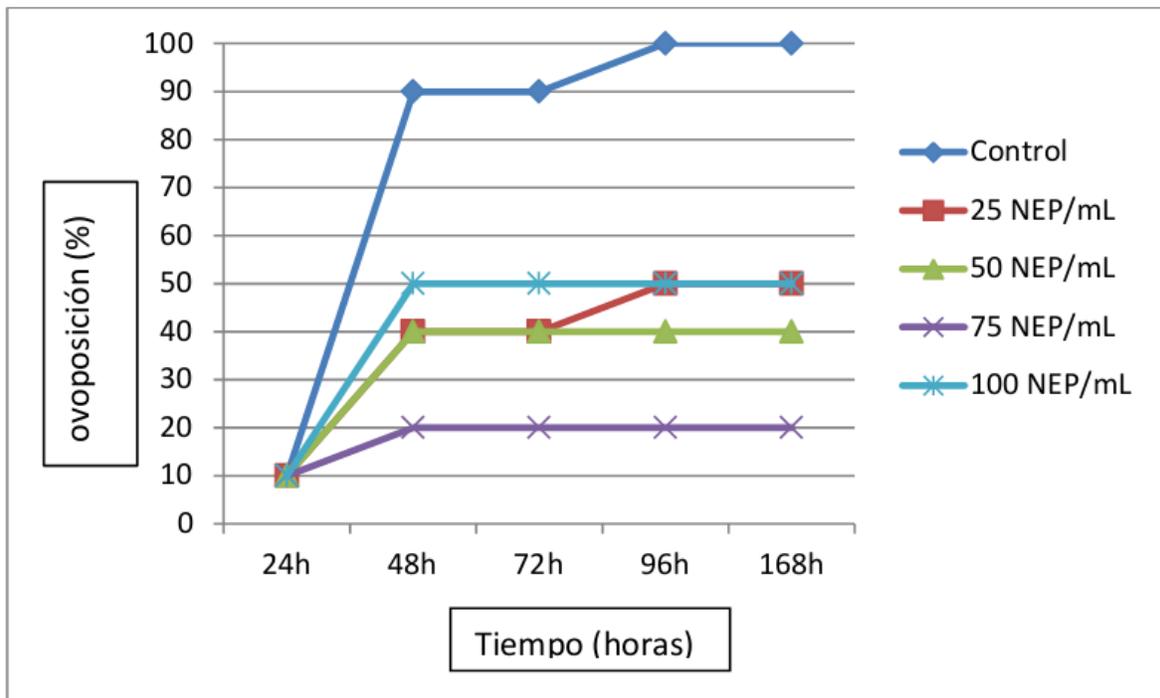


Figura 5: Porcentaje de ovoposición de adultas de *Boophilus microplus*, expuestas a diferentes concentraciones de infestivos juveniles (ij_3) de *Heterorhabditis indica*.

El índice ovoposicional, modificado del índice de reproductividad de las garrapatas arrojó que en la medida que aumenta la concentración de nematodos disminuye notablemente la cantidad de huevos puestos por una hembra, reduciéndose desde un 62 % en el control hasta un 9 % para la concentración de 100 nematodos por adulta. (Figura 6)

Las hembras adultas dejaron de moverse y sus mismas defensas, aunque poseen una respuesta a los nematodos entomopatógenos, estos incidieron en una reducción de la ovoposición, manifestando la actividad parasítica de estos agentes de control biológico.

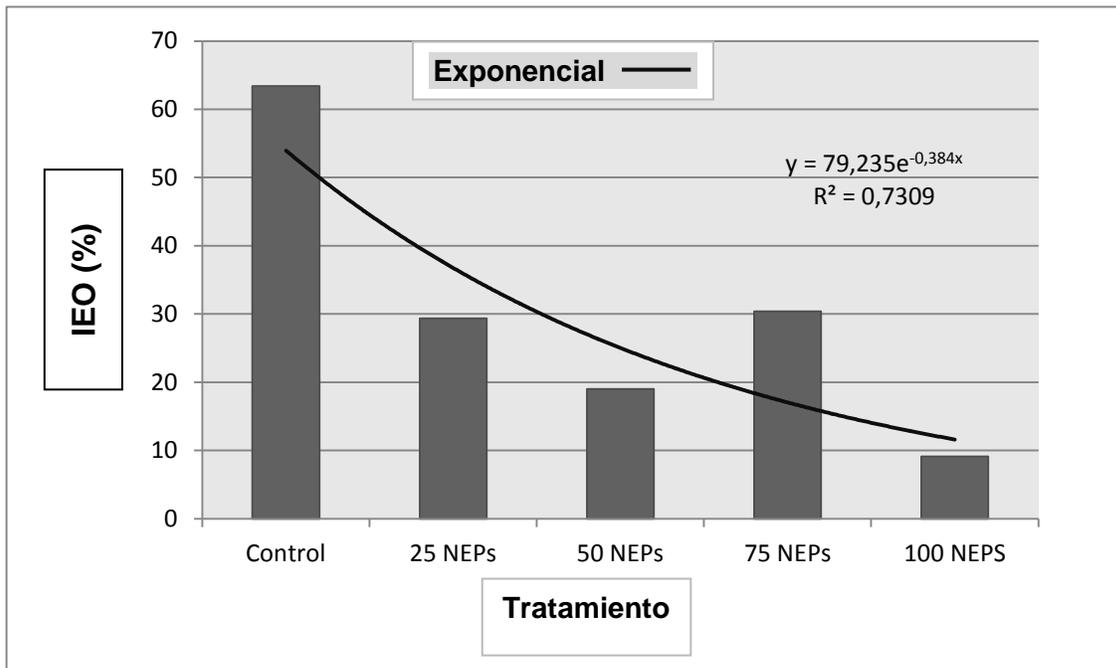


Figura 6: índice de eficiencia ovoposicional (IEO) de adultas de *Boophilus microplus* expuestas a diferentes concentraciones de infectivos juveniles (ij_3) de *Heterorhabditis indica*.

Discusión



5. DISCUSIÓN

Una de las peores plagas de la ganadería tropical lo constituye la garrapata *Boophilus microplus* (Grisi *et al.*, 2002), que en Cuba sobre ganado vacuno, en los meses de sequía causa serios estragos, por ser este un componente fundamental del ciclo biológico de la garrapata y un hospedante por excelencia (Gonzales, 1974).

Los resultados de presente estudio a través de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis indica* Poinar cepa P₂M), aportan la novedad de contar con un elemento biológico en el control de estas garrapatas, y por vez primera se realizan estudios de su respuesta concentración de nematodos y mortalidad tanto en larvas, elemento muy poco tratado en la ciencia universal, al no contar con literatura referente al caso, y con adultos, aspecto que corroboran trabajos realizados por algunos autores.

5.1 Susceptibilidad de larvas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Cuando se aplicaron a larvas por vez primera se obtuvieron resultados en este sentido, con un 80 % de mortalidad en concentraciones de 200 ij₃ y 400 ij₃ por larva de garrapata. A menores concentraciones, las muertes llegaron al 60 %. Estos resultados son muy importantes porque demostraron aspectos interesantes dentro del control biológico como son:

1. Los nematodos entomopatógenos son agentes de control biológico capaces de provocar la muerte a larvas de garrapata *B. microplus*; Primer reporte en Cuba y en el área latinoamericana, pues se carece de bibliografía que mencione el control que pueden ejercer los nematodos entomopatógenos en estados juveniles de vida libre de garrapatas del ganado.
2. Las concentraciones de nematodos empleadas son sumamente bajas, no coincidiendo con la mayoría de los autores que refieren para estas pruebas de susceptibilidad concentraciones por encima de las empleadas.

En el control de la polilla *Tecia solanivora* Xuejuan et al., 2000 mediante estos agentes de control biológico utilizaron concentraciones muy semejantes a las nuestras con buenos resultados de un 86 % a concentraciones de 280 ij₃ por larva, uno de los pocos casos en que se emplearon bajas concentraciones. Por otra parte Rodríguez et al., (2004), utilizó concentraciones de 1500 y 3000 ij₃ en estudios de control biológico preliminares sobre *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), concentraciones de 1100 ij₃ más que las nuestras, para lograr una efectividad menor. En ensayos realizados por sobre el picudo negro del plátano *Cosmopolites sordidus*, realizado en placas de petri, con papel toalla en el fondo. Se añadió la suspensión de nematodos en concentraciones (0, 1000, 1500, 2000 y 2500 nematodos/larva, lo que supone altas concentraciones para lograr en algunos insectos una mortalidad total.

Muy poco se reconoce en la literatura el tratamiento a ácaros con nematodos entomopatógenos, como la patente establecida a base de quitosana y nematodos producida por Martínez, (2005) quien reconoce a adultos de *Boophilus pinniperda*, *Dermacentor vaviabilis* y *Amblyoma cajennense*, como susceptibles a la combinación patentada.

De todo ello se desprende la importancia de este estudio y de la posibilidad de recomendar la realización del mismo en zonas ganaderas, y pruebas en los pastizales.

5.2 Susceptibilidad de adultas de *Boophilus microplus* a nematodos entomopatógenos

Cuando se analizó los resultados obtenidos sobre las garrapatas adultas, estos fueron aún más promisorios, alcanzándose la mortalidad de las adultas en todas las concentraciones y tratamientos realizados, a excepción del control que no tuvo ninguna muerte, lo que demuestra la efectividad de los nematodos entomopatógenos para controlar los estados adultos de esta especie.

Estos resultados coinciden con Freitas-Ribeiro et al. 2005, quienes utilizando al nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser), lograron en todas las concentraciones el 100 % de mortalidad, pero sus concentraciones fueron muy superiores; de 600, 3000, 6000 y 30000 infestivos juveniles de *S. carpocapsae*; aspecto que es meritorio en nuestros ensayos y que es notable para las condiciones de reproducción de estos nematodos en las condiciones cubanas.

Un aspecto positivo de este estudio es que otras especies de garrapatas del ganado poseen estructuras diferentes a *B. microplus*, y la invasión de infestivos juveniles se hace bien difícil, ya que las aperturas naturales como el spiracles, ano, boca y poro genital según Wouts, (1991), son lugares propicios más complejos en este tipo de ixódido.

Los resultados obtenidos no coinciden con Máuleon et al. (1993), quien expone que esta especie de garrapata sobrevivió a concentraciones de 1000 infestivos juveniles, con la especie *S. carpocapsae*, pues según este autor, el hemocele de las garrapatas es un lugar inhóspito que rechaza e inhibe el desarrollo de los nematodos, este último aspecto es coincidente en el hecho de que es casi imposible recuperar los i₃ de los cuerpos muertos de estas garrapatas.

En los experimentos del laboratorio, el tiempo de adquisición de los nematodos entomopatógenos se relaciona directamente a su infestividad y a la concentración de los mismos, aspecto que coincide con Downes (1996) quien mostró que los infestivos juveniles de nematodos que matan al hospedante son menos patogénicos que la primera generación que se reproduce en su interior y si esta no tiene lugar, sencillamente el tiempo de muerte se extiende, aspecto coincidente con nuestro estudio que se alargó hasta las 96 y 168 horas.

Samish et al. (1999) también encontró un aumento de mortalidad en *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma excavatum* y *Rhipicephalus bursa* cuando se aumentaron las concentraciones. Esta correlación, en nuestro experimento fue positiva, debido a

que nunca se elevaron las concentraciones como las empleadas por estos autores de hasta 30000 ij₃ como Freitas-Ribeiro et al. 2005.

Otro resultado muy alentador es las concentraciones para Cuba lo es sin lugar a dudas las respuestas obtenidas con las concentraciones letales medias, las que para larva y adultas fueron de 62.5 y 6.5 ij₃ por cada individuo de esos estados. Por vez primera se obtienen estos datos para Cuba, y el estado larval, siempre uno de los más susceptibles en todos los invertebrados, en este caso resultó más resistente que el adulto, debido entre otras cosas a su constante movimiento que hacen que el encuentro agente biológico diana se dificulte, no siendo así para las adultas que son perezosas a causa de la gravidez por las masa d huevos presentes.

En este sentido es importante destacar que las hembras grávidas, que fueron expuestas a tratamientos con nematodos entomopatógenos tuvieron una ovoposición casi un 60 % menor, lo que se traduce en una menor presencia de esta especie en potreros que en un futuro puedan ser tratados con esta agente de control biológico.

Estos resultados coinciden con Kocan *et al.*, 1998, quienes utilizando las especies de nematodos *S. riobravis* y *S. feltiae* frente a la garrapata *Amblyomma maculatum* encontraron una reducción significativa en las masa de huevos puestas.

Cuando se analiza el índice de ovoposición para *B. microplus* se evidenció una reducción de más de un 50 %, aspecto coincidente con Santos y Furlong (2002), quienes lograron reducir el mismo al tratar a hembras en un 46.18% a 47.8%.

Con respecto a concentraciones letales que mataron 50% de hembras grávidas, los resultados son muy prometedores, y coinciden con otras especies de nematodos entomopatógenos como *S. carpocapsae* dónde su valor de CL₅₀ fue muy bajo para estas hembras a diferencias de otras no grávidas. Samish y Glazer (1992)

No existen muchos trabajos relacionados con este tema en el mundo. En Brasil con Freitas-Ribeiro *et al.* 2005 se recoge en ellos algunos de los más significativos, pero en realidad el mundo adolece de este tipo de trabajo, con aportes relevantes y una gran importancia para mejorar la ganadería cubana.

Este estudio mostró el control que sobre las garrapatas pueden establecerse por los nematodos del entomopatógenos como una alternativa y herramienta a tener en cuenta para que no se empleen productos químicos en que le ocasionan daño al ambiente y que podría reducirse favorablemente, al aumentar la biodiversidad y por ende las producciones de leche que tanto necesita en este momento el país.

5.3 Determinación de la CL_{50} de nematodos entomopatógenos por larvas y adultas de *B. microplus*

Otro resultado muy alentador corresponde a las concentraciones para Cuba lo es sin lugar a dudas las respuestas obtenidas con las concentraciones letales medias, las que para larva y adultas fueron de 62.5 y 6.5 μg por cada individuo de esos estados. Por vez primera se obtienen estos datos para Cuba, y el estado larval, siempre uno de los más susceptibles en todos los invertebrados, en este caso resultó más resistente que el adulto, debido a su constante movimiento, lo que hace que el encuentro con el agente biológico diana se dificulte, no siendo así para las adultas que son perezosas a causa de la gravidez por las masa de huevos presentes.

Con respecto a las concentraciones letales que mataron al 50% de hembras grávidas, los resultados son muy prometedores, y coinciden con otras especies de nematodos entomopatógenos como *S. carpocapsae* donde su valor de CL_{50} fue muy bajo para estas hembras a diferencias de otras no grávidas. Samish y Glazer (1992).

5.4 Efecto de los nematodos entomopatógenos en el comportamiento ovoposicional y cantidad de huevos puestos de adultas de *B. microplus*

En este sentido es importante destacar que las hembras grávidas, que fueron expuestas a tratamientos con nematodos entomopatógenos tuvieron una ovoposición

casi un 60 % menor, lo que se traduce en una menor presencia de esta especie en potreros que en un futuro puedan ser tratados con esta agente de control biológico.

Estos resultados coinciden con Kocan *et al.*, 1998, quienes utilizando las especies de nematodos *S. riobravis* y *S. feltiae* frente a la garrapata *Amblyomma maculatum* encontraron una reducción significativa en las masa de huevos puestas.

Cuando se analiza el índice de ovoposición para *B. microplus* se evidenció una reducción de más de un 50 %, aspecto coincidente con Santos y Furlong (2002), quienes lograron reducir el mismo al tratar a hembras en un 46.18% a 47.8%.

Conclusiones



6. CONCLUSIONES.

1. Tanto larvas como adultos de como *B. microplus* resultaron susceptibles a *H. indica*, en condiciones de laboratorio.
2. Las concentraciones letales de *H. indica*, sobre *B. microplus* fueron de 62.5 μg /larva y 6.5 μg /adulto.
3. Los cambios en los parámetros reproductivos cuando se aplicó tratamientos con *H. indica*, redujeron más de un 50 % las ovoposiciones en las hembras.

Recomendaciones



7. RECOMENDACIONES.

1. Continuar los estudios con nematodos entomopatógenos sobre estas garrapatas en Cuba.
2. Implementar la metodología para la aplicación de los mismos en áreas de pastizales y la realización de estos ensayos sobre pastos y ganado.

Referencias Bibliográficas



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◆ Akhurst, R.J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology*, 128, 3061-3066.
- ◆ Akhurst, R.J. (1983). Taxonomy study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect nematodes. *International System Bacteriology*, 33, 38-45.
- ◆ Akhurst, R.J., y Dunphy, G.B. (1993). Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria nematodes, and their insects hosts. En N.E. Beckage, S.N. Thompson y B. Federici (Eds.), *Parasites and pathogens of insects*, Vol. 2, (pp. 1-23). Academic Press, San Diego.
- ◆ Arteaga, E.; E. Fernández, T. Vázquez. 1994. Los nematodos entomopatógenos. Situación actual y perspectivas. III Simposio Internacional de Zoología. Ciudad de la Habana.
- ◆ Barker, S.C., Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 129:15-36.
- ◆ Basto E., G.; S. Fragoso H., V. Z. García S., V. R. Rodríguez I., A. Rosado A., C. Rosario R. 2006. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Universidad Autónoma de Yucatán. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Parasitología Veterinaria. CENID-PAVET, Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SAGARPA. Industria Farmacéutica Veterinaria-Comisión de Parasiticidas. Publicación Técnica, No. 4. 36pp; http://www.uady.mx/~veterina/cuerpos/salud_animal/Manual.pdf; (consultado 20.03.2011).

- ◆ Beeding, R. A. and A.S. Molyneux. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359
- ◆ Bird, A.F., y Akhurst, R.J. (1983). The natural of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal Parasitology*, 13, 599-606.
- ◆ Boemare, N.E., Boyer-Giglio, M.H., Thaler, J.O., Akhurst, R.J., y Brehelin, M. (1992). Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 58 (9), 3032-3037.
- ◆ Boemare, N.; C. Laumond and H. Mauleon. 1996. The entomopathogenic nematode- bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Sci. Technol.* 6 (3): 333-345.
- ◆ Caeiro, V. 2006. Reflexão sobre a taxonomia actual dos Ixodidae. A sistemática morfológica versus sistemática molecular - o género *Rhipicephalus* e o género *Boophilus* *Revista portuguesa de ciências veterinárias rpcv* 101: 557-558 p. 37-39
- ◆ Castro, M.B., Wright, S.A. 2007. Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *Journal of Vector Ecology.* 32:140-9.
- ◆ Cen A J, V R I Rodríguez, A J L Domínguez, G Wagner. 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia* spp on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 78,253-257.
- ◆ CORDOVÉS, C.O.; TAMAYO, S.; FLEITE, R. Pérdidas económicas producidas por las garrapatas en Cuba. 1. ed. Informativo Técnico. Directivo Nacional del Instituto de Medicina Veterinaria, 1980. 17p.
- ◆ De la Vega, R y Ortiz, R. (1985). Métodos de lucha contra las garrapatas. Ed. ENPES. Veterinaria. Cuba. pp 1-19.

- ◆ Doucet, M. M. A. y A. Giayetto. 1994. Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae : Nematoda). *Nematol. Medit.* 22: 171-178
- ◆ DOUCET, M.M.A.; MIRANDA, M.B.;BERTOLOTTI, M.A. Infectivity of entomogenous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae). *Fund. Appl. Nematol.*, v. 21, n. 1, p. 13-16, 1998.
- ◆ Downes, M. J. and Griffin, C. T. (1996), Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 347-356.
- ◆ Dunphy, G.B., y Webster, J.M. (1988). Lipopolysaccharides of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non - immune *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larvae. *Journal of General Microbiology*, 134, 1017-1028.
- ◆ Dunphy, G.B., y Thurston, G.S. (1990). Insect immunity. En R. Gaugler y H-K-Kaya (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 301-323). Boca Raton, Fl.: CRC Press,
- ◆ Ehlers. R.; Peters Arne 1996: *Entomopathogenic nematodes in biological control: Feasibility. Perspectives and Risks.* Cambridge University Press. 119-126 p.
- ◆ Endo, B.Y., y Nickle, W.R. (1991). Ultrastructure of the intestinal epithelium, lumen and associated bacteria in *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal Helminthology Society Washington*, 58, 202-212.
- ◆ 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.
- ◆ Freitas-Ribeiro, Gláucia Marques; J. Furlong; Viviane Oliveira Vasconcelos; Cláudia Dolinski y A. Loures-Ribeiro. (2005). Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All strains

(Steinernema: Rhabditida). Braz. arch. biol. technol. vol.48 no.6 Curitiba Nov. 2005

- ◆ Friedman, S. (1978). Trehalose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. Annual Review of Entomology, 23, 389-407.
- ◆ Gaugler, R., LeBeck, L., Nakagari, B., y Boush, G.M. (1980). Orientation of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpopapsae* to carbon dioxide. Environmental Entomology, 9, 649-652.
- ◆ Gaugler, R.1981. Biological control potential of neoplectanid nematodes. J. Nematol. 13:241-249
- ◆ Gaugler, R. 1987. Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. Pp 457-484. En Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cells Culture. K. Maramorosch (Ed) . New York. Academic Press.
- ◆ Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insect's pest with entomopathogenic nematodes. Agric Ecosyst. Environ. 24: 351-360.
- ◆ Gaugler, R., McGuire, T., y Campbell, J. (1989). Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. Journal of Nematology, 21, 247-253.
- ◆ Gaugler, R., y Kaya, H.K. (1990). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, Fl.: CRC Press.
- ◆ Georgis, R., y Hague, N.G.M. (1991). Nematodes as biological insecticides. Pesticide Outlook, 2, 29-32.
- ◆ GEORGIS, R.; MANWEILER, S.A. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. Agricultural Zool. Rev., v.6, p.63-94, 1994.
- ◆ Glazer, I.; L. Salame and D. Segal. 1997. Genetic enhancement of nematocide resistance in entomopathogenic nematodes. Biocontrol Sci. Technol. 7(4): 499-512.
- ◆ GONZALES, J.C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre: Sulina, 1974. 103p.

- ◆ Gothama, A. A. A; P. P. Sikorowski and G. W. Lawrence. 1995. Interactive effects of *Steinernema carpocapsae* and *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus on *Spodoptera exigua* larvae. *J. Invert. Path.* 66(3): 270-276.
- ◆ Graf et al., 2004 Graf, J.F.; Gogolewsk, N.; Le ach-Bing, G.A.; Sabatini, M.B.; Molento, E.L. Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129, S427–S442.
- ◆ Grewal, P.S., y Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. En F.R. Hall y J.J. Menn. (Eds.), *Methods Biotechnology. Biopesticides: Uses and Delivery.* (pp. 271-299). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- ◆ GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária* ,v.21, n.125, p.8-10, 2002.
- ◆ Guglielmone, A.A.; Szabó, M.P.J.; Martins, J.R.S.; Estrada-Peña, A., 2006. A Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M. & Bechara, G.H. (orgs.) *Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.* São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan. ISBN: 85-99909-01-0 pp. 223.
- ◆ Hara, A. H; H. Kaya. 1993. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ. Entomol.* 12(2): 496-501
- ◆ Huerta, R y Rodríguez, C.(1999). Evaluación de la actividad de extractos acuosos del NIM (*Azadirachta Indica* (L1) Juss.) (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Castrini). IV Sem. Intenac. Parasitol. Anim. Puerto Vallarta. Jalisco México, oct. 20-22. pp 121-22.
- ◆ Ishibashi, N. and E. Kondo. 1986. A possible quiescence of the applied entomogenous nematode *Steinernema feltiae*, in soil. *Jpn. J. Nematol.* 16: 66-67.

- ◆ 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.
- ◆ Ishibashi, N., Takii, S., y Kondo, E. (1994). Infectivity of nictation juveniles of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditidae: Steinernematidae). *Japanese Journal of Nematology*, 24, 20-29.
- ◆ Kay BH, Kemp H. Vaccines against arthropods. *Am J Trop Med* 1994;50:87-96.
- ◆ Kemp D.; Mckenna R.; Thulluen N. and Willadsen (1999). Estrategias para el control de la garrapata en el mundo de la resistencia acaricida. CSIRO Tropical Agricultura, university of Queensland pp. 1-10.
- ◆ Kemp, D., F. Thullner, K. Gale, A. Nari & G. Sabatini. 1998. Report to the Animal Health Services, AGAH, FAO, CSIRO, Sidney, Australia.
- ◆ Klein, M.G. (1990). Efficacy against soil- inhabiting insects pest. En Gaugler, R. y Kaya, H.K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 195-214). Boca Raton, FL.: CRC Press.
- ◆ Kocan, K. M.; Blouin, E. E.; Pidherney, M. S.; Claypool, P. L.; Samish, M. and Glazer, I. (1998), *Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method for ticks*. *Annals New York Academy of Sciences*, 355-364.
- ◆ Lima W S, M F Ribeiro, M P Guimaraes. 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 32, 375-380
- ◆ Lombardero, O. J.; Moriena, R. A y Racioppi, O.(1984). Acción de las ivermectinas sobre *Boophilus microplus* (CAN) *Vet. AVG.* 1(4) : 376-80.
- ◆ Manmon. Catherina. M; R.K. Janson (1993) : Within root Mortality of *Cylas formicaries* (Coleoptera . Apionidade) by entomopathogenic nematodes. *Biological and Microbial Control Entomological Society of America*. p.p. 723-729p.

- ◆ Martínez Pena, A. (2005). Plaguicida biológico basado en quitosano y nematodos entomopatógenos. Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 –28036 Madrid.
- ◆ Mauléon, H.; Barré, N. and Panoma, S. (1993), Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). *Experimental and Applied Acarology*, 17, 831-838.
- ◆ McKenzie, K. E. (1998). Largest Blood Meal. University of Florida, Book of Insect Records, Chapter 31, Department of Entomology & Nematology. University of Florida, 32611-0620, pp 76-79.
- ◆ Medina, R. G. Salcedo, E. Tapia. (2005). Evaluación de la patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de *Cosmopolites sordidus*. Universidad de Guayaquil, Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces, Vinces, Los Ríos, Ecuador
- ◆ Mulla M.S. and Su T. (1999) Activity and biological effect of Neem products against arthropods of medical and veterinaria importance. *J. Am Control Assoc.* Jun 15(2):133 - 152.
- ◆ Murrell, A. y Barker S. C. 2003. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56: 169–172.
- ◆ Nuñez J., L.; M. Muñoz C. y H. Moltedo, L. 1982. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp. 121-164.
- ◆ Panella, N.A., J. Karchesy, G.O. Maupin, J.C.S. Malan & J. Piesman. 1997. Susceptibility of immature *Ixodes scapularis* (Acari: ixodidae) to plant-derived acaricides. *J. Med. Entomol.* 34: 340-345.
- ◆ Patarroyo, J.H.; Vargas, M.I.; Gonzáles, C.Z.; Gusmán, F.; Martins-Filho, O.A.; Afonso, L.C.C.; Valente, F.L.; Peconick, A.P.; Marciano, A.P.; Patarroyo, V.A.M.; Sossai, S. 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic

vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* . Vet. Parasitol. 166: 333–339.

- ◆ Perry, R.N. (1993). Chemioreception in plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 34, 181-199.
- ◆ Poinar, G. O.; Jr. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.) Nematologica 21: 463-470.
- ◆ Poinar, G. O.; Jr. G. M. Thomas; S.B. Presser and J. L. Hardy. 1982. Inoculation of entomogenous nematodes, *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* and their associated bacteria, *Xenorhabdus* spp. into chicks and mice. Environ. Ent. 11(1): 137-138
- ◆ Poinar, G.O.Jr. (1989). Non-insect hosts for the entomogenous rhabditid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). Revue de Nématologie, 12, 423-428.
- ◆ Poinar, G.O.Jr. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En R. Gaugler y H.K. Kaya (Eds.), Entomopathogenic nematodes in biological (pp. 23-61). Boca Raton, Fl.: CRC Press.
- ◆ Redondo, M.; Fragoso, H.; Ortis, M.; Montero, C.; Lona, J.; Fría, R.; Hernández, V.; Franco, R.; Machado, H.; Rodríguez, M. and de la Fuente, J. (1999). Integrated control of acaricide-resistant *B. microplus* population on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. Experimental and Applied Acarology. 23: 841-848.
- ◆ Reed, D. K.; G. L. Reed and C. S. Creighton. 1986. Introduction of entomogenous nematodes into trickle irrigation systems to control striped cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 79(5): 1330-1333.
- ◆ Rodríguez Solano, R.; Consuelo Almazan García e I. Amendariz González. (2004). Entomopathogenic nematodes for biological control of horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), preliminary studies. Rev. Vet. México 35(4):339-350, 2004.

- ◆ Rodríguez, V.R.I.; Quiñones, A.F.; Fragoso, S.H. 2005 . Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Edit. McGraw-Hill- UADY, México. pp 571–592.
- ◆ Rosario, C.R., Hernández, O.R. 2001. Evolución química de la resistencia a acaricidas. Memorias de Curso-taller “Sobre diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*”. Septiembre 26-28; Jiutepec, (Morelos) México. SAGARPA, FAO.
- ◆ Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. Parasitol 2004;129:S389-S403.
- ◆ Samish, M and Glazer, I. (1992). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Arachnida: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, 29 : (4), 614-618.
- ◆ SAMISH, M. et al. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes: research update. Annals of the New York Academy of Sciences, v.916, p.589-594, 2000. <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/120752301/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>>. consultado: (21 nov. 2010).doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05341.x.
- ◆ Samish, M.; Alekseev, E. and Glazer, I. (1999), Interaction between ticks (Acari: Ixodidae) and pathogenic nematodes (Nematoda): susceptibility of tick species at various developmental stages. Journal of Medical Entomology, 36 : (6), 733-740.
- ◆ Santos, A. P. dos and Furlong, J. (2002), Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. Ciência Rural, 32 : (6), p. 1033-1038.
- ◆ Schmidt, J and J, N. All. 1998. Chemical attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to insect larvae. Environ Entomol. 7(4): 605-607.

- ◆ Simões, N., y Rosa, J.S. (1996). Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 403-411.
- ◆ SMART JR, G.C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *J. Nematol.*, V.27, n.4S, p.529-534, 1995.
- ◆ Solís S., S. 1986. Ecología de garrapatas en México. Memorias del 1er Seminario Internacional de Parasitología Animal. CNPA. DGSPAF. México. 138pp.
- ◆ Sulestyanto. Didik.Ralf- Undo Ehters (1996): Efficacy of the Entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis meigidis* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in Golf course Turf. *Biocontrol Sei Technolo.* 6: 247-250 p.
- ◆ Sutherst , R. W.; G. A. Norton, N. D. Barlow, G. R. Conway, M. Birley and H. N. Comins. 1979. An Analysis of management strategies for cattle tick (*Boophilus microplus*) control in Australia. In: *The Journal of Applied Ecology*, Vol. 16, No. 2 (Aug., 1979), pp. 359-382; [http://links.jstor.org/sici?Sici=00218901\(197908\)16%3A2%3C359%3AAAOMSF%3E2.0.CO%3B2-X](http://links.jstor.org/sici?Sici=00218901(197908)16%3A2%3C359%3AAAOMSF%3E2.0.CO%3B2-X); consultado: (24.12.2010).
- ◆ Sutherst R W. 1983. Management of arthropod parasitism in livestock. World association for the advancement of veterinary parasitology. Ed. Dansmore. pp. 41-56.
- ◆ TAYLOR, D.B.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.J. et al. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Biol. Control*, v.27, n.6, p.1514-1519, 1998.
- ◆ Thrusfield, M.V. 1997. The Design and Conduct of Clinical Trials. Defining Efficacy. Efficacy of ectoparasitic preparations, p. 225-246. In J.P.T.M. Noordhuizen, K. Frankena, C.M. Van der Hoofd & E.A.M. Graat. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*, Wageningen, Holanda.

- ◆ THULLNER, F. Impact of pesticide resistance and network for global pesticide resistance management based on a regional structure. *World Anim Review*, R M Z, v.89, p.41-47, 1997.
- ◆ 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.
- ◆ Timper, P., Kaya, H.K., y Jaffee, B.A. (1991). Survival of entomogenous nematodes in soil infected with the nematode-parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control*, 1, 42-50.
- ◆ Vasconcelos, V.O., Furlong, J., Freitas, G.M., Dolinski, C., Aguilera, M.M., Rodrigues, R.D., Prata, M., 2004 . *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 94, 201–206.
- ◆ Villaba G. Y Stendel W. (1976) Informe técnico IMV. La Habana, Cuba.
- ◆ Wallace, H. R. and C. C. Doncaster. 1964. A comparative study of the movement of some microphagous, plant parasitic and animal parasitic nematodes. *Parasitology*: 54:313.
- ◆ 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.
- ◆ Woodring Jennifer. L and H. Kaya 1988. *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes: A hand handbook of biology and Techniques. *Southerncoopers Bull.* (331): 1-30 p.
- ◆ Wouts, W. M. (1991), *Steinernema* (Neoplectana) and *Heterorhabditis* species. In: Nickle, W. R. (Ed.). *Manual of agricultural nematology*. New York. pp. 855-897.
- ◆ Xuejuan Fan, A. Maggiorani y S. Gudiño. (2000). Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de polilla (Tecia

solanivora), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Merida-Venezuela. Rev. Forest. Venez. 44(1):115-118, 2000.