

MEJORAMIENTO DE LA TOLERANCIA AL CALOR Y LA DESECACIÓN DE TRES NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

J. Ruiz-Vega*, F. Ruiz-Carballo, R. Pérez-Pacheco, and S. H. Martínez-Tomás

Departamento de Protección Vegetal, CIIDIR Unidad Oaxaca, IPN. Hornos 1003 Sta. Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México 71230.

*Autor para correspondencia: jvega@ipn.mx

ABSTRACT

Ruiz-Vega, J., F. Ruiz-Carballo, R. Pérez-Pacheco, and S. H. Martínez-Tomás. 2011. Improvement of heat and desiccation tolerance of three entomopathogenic nematodes. *Nematopica* 41: 264-270.

Entomopathogenic nematodes (EPN) have potential to be used as biological control agents against white grubs (*Phyllophaga* spp.), but high temperatures and low water activity (A_w) may restrict their usefulness. The objective of this work was to generate lines tolerant to heat and desiccation of three species of EPN (*Steinernema glaseri* Steiner strain NC, *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar and Raulston, and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar strain NC1). The treatments for selection of heat tolerance were applied to infective juveniles (IJ) reared in third-instar larvae of *Galleria mellonella* in six successive generations, at 25, 30, and 35°C for 48 h. For selection of desiccation tolerance, water activities of 0.86, 0.90, 0.97, and 1.0 were also applied for 48 h to IJ obtained from generations F1 to F6. As water activity decreased, survival also decreased. After the F3, *S. glaseri* became the most tolerant to desiccation, followed by *S. riobrave*. At the lowest A_w , these nematodes showed 45.6 and 33.8% survival, respectively. After the F3, the three species also increased their tolerance to high temperatures, especially *S. glaseri* and *H. bacteriophora*, which showed survival rates of 84.8 and 69.8%, respectively, at 35°C in the F6. The tolerant lines were evaluated using second-instar larvae of *Phyllophaga vetula* Horn, an important pest in the region where the study was conducted. *Steinernema riobrave* and *H. bacteriophora* showed good control at low A_w (0.86), while *S. glaseri* and *S. riobrave* showed good control at high temperature (35°C).

Key words: heat, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*, water activity.

RESUMEN

Ruiz-Vega, J., F. Ruiz-Carballo, R. Pérez-Pacheco, y S. H. Martínez-Tomás. 2011. Mejoramiento de la tolerancia al calor y a la desecación de tres nematodos entomopatógenos. *Nematropica* 41:264-270.

Los nematodos entomopatógenos (NE) poseen potencial como agentes de control biológico de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.); sin embargo, la temperatura ambiental y la baja actividad de agua (A_w) restringen su uso. Los objetivos del presente estudio fueron generar líneas tolerantes al calor y a la desecación en tres especies de NE (*Steinernema glaseri* Steiner cepa NC, *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar y Raulston y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa NC1). Los tratamientos para selección de tolerancia al calor se aplicaron a infectivos juveniles (IJ) reproducidos en larvas de tercer instar de *Galleria mellonella* en seis generaciones sucesivas, con temperaturas de 25, 30 y 35°C por 48 h; para la selección de resistencia a la desecación se aplicaron actividades del agua de 0.86, 0.90, 0.97 y 1.0, también por 48 h, a IJ obtenidos de la F1 a la F6. A medida que la A_w fue menor, la sobrevivencia de los nematodos disminuyó, pero después de la F3 *S. glaseri* fue el que acumuló más tolerancia a la desecación, seguido por *S. riobrave*. A la menor A_w aplicada, estos nematodos alcanzaron 45.6 y 33.8% de sobrevivencia. También después de la generación F3, las tres especies de nematodos incrementaron su tolerancia a las altas temperaturas, especialmente *S. glaseri* y *H. bacteriophora*, los cuales alcanzaron sobrevivencias en la F6 de 84.8 y 69.8% a 35°C. En la evaluación de la tolerancia adquirida por las líneas se utilizaron larvas de segundo instar de *Phyllophaga vetula* Horn, que es una plaga importante en la región de estudio, sobresaliendo *S. riobrave* y *H. bacteriophora* por su capacidad de controlarlas a bajos A_w (0.86), mientras que por su capacidad de controlarlas a altas temperaturas (35°C) sobresalieron *S. glaseri* y *S. riobrave*.

Palabras clave: actividad del agua, calor, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*.

INTRODUCCIÓN

En México hay pocas experiencias documentadas del uso de nematodos como agentes de control biológico de insectos plaga. Los trabajos se han enfocado en la búsqueda de nuevos aislamientos y para determinar la efectividad en campo de especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis* producidas comercialmente (Alatorre, 1999).

Los nematodos entomopatógenos (NE) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos obligados, por requerir de un hospedero para completar su ciclo; los NE son portadores de bacterias que matan al insecto y además contribuyen a la deradación de los tejidos para su reproducción. El juvenil J3 de tercer estadio del NE emerge del cadáver del hospedero y puede permanecer por meses en el suelo hasta que encuentra otro hospedero (Kaya y Koppenhofer, 1996).

El éxito al utilizar NE para controlar plagas depende de la compatibilidad con la plaga y una interacción favorable con el ambiente, además de alta virulencia, persistencia y capacidad de búsqueda. La reproducción de los NE en laboratorio puede afectar dichos atributos debido a procesos que incluyen erosión genética, endogamia o selección involuntaria. Una alternativa para fijar estos atributos es la formación de líneas genéticamente uniformes por medio de autocruces (Bilgrami *et al.*, 2006).

Los NE tienen muchas ventajas como agentes de control en comparación con los plaguicidas químicos, no contaminan y son seguros para el medio ambiente, a tal grado que están exentos de registro por parte de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los E.U.A. (Cabanillas, 1999). También algunos NE buscan activamente a su hospedero; por lo cual tienen una alta capacidad en el control de insectos barrenadores y algunas plagas subterráneas (Alatorre y Guzmán, 1999).

El uso extensivo de los NE está limitado por su susceptibilidad a factores como la desecación y altas temperaturas; se ha encontrado que una de las formulaciones más efectivas es la que incluye a los nematodos en latencia en minerales arcillosos. Si los nematodos fueran más tolerantes a la desecación, podrían prolongar su viabilidad por más tiempo (Strauch *et al.*, 2004).

La baja tolerancia de los NE a contenidos de agua menores a 0.86 de A_w y a temperaturas mayores de 27°C, limita su utilización comercial y reduce su efectividad para el control de plagas en condiciones de campo (Griffin, 1993; Segal y Glazer, 2000; Strauch *et al.*, 2004). Por consiguiente, con el objetivo de obtener líneas de NE tolerantes a la desecación (baja actividad de agua) y a altas temperaturas, en esta investigación se realizó un proceso de selección de los infectivos juveniles (IJ) sobrevivientes después de aplicar tratamientos de baja, media y alta A_w (0.86, 0.90, 0.97 y 1.0 A_w), así como tratamientos de temperaturas altas,

medias y bajas (25, 30 y 35°C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y manejo general

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Control biológico del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Oaxaca, que se encuentra ubicado en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México, a 17° 02' N y 96° 44' O y a una altitud de 1,550 m (INEGI, 2002).

Con una pala cuadrada se realizó la recolección de larvas de la gallina ciega *P. vetula* en los terrenos de la población de Rancho Quemado, Cuilapam de Guerrero, Oax.; y se colectó suelo húmedo en charolas de 40 x 50 x 10 cm, en las que las larvas se trasladaron al laboratorio. Luego, se sembraron semillas de maíz para que las larvas se alimentaran de las raíces y se almacenaron dos a tres semanas antes de utilizarse en los bioensayos (Ruiz *et al.*, 2003).

Los NE (*S. glaseri* Steiner cepa NC, *S. riobrave* Cabanillas, Poinar y Raulston y *H. bacteriophora* Poinar cepa NC1), se reprodujeron en laboratorio usando larvas de tercer instar de *G. mellonella*. Estas fueron infectadas aplicando 20 juveniles infectivos por larva en cajas petri de 90 mm diam, forradas con papel filtro. Después de infectadas, las larvas muertas se transfirieron a trampas "White" para su emergencia (White, 1927). Los nematodos se almacenaron por menos de tres semanas a 15°C y después se usaron en los bioensayos.

Generación de líneas de nematodos tolerantes a la desecación

Los tratamientos de niveles de desecación (0.97, 0.90 y 0.86 de A_w) aplicados a las tres especies de nematodos se obtuvieron con tres concentraciones de polietilenglicol (PEG 8000); aplicando 3, 5 y 7 g de PEG 8000 por cada 10 ml de agua destilada, respectivamente. Cada caja petri recibió mil IJ de tres especies de NE, los cuales se sometieron a estas A_w por 48 h y después se evaluó el porcentaje de sobrevivencia. Para obtener la generación siguiente, con los nematodos sobrevivientes en cada A_w o del siguiente nivel de A_w cuando no hubo sobrevivencia, se infectaron diez larvas de *G. mellonella*. Posteriormente, la progenie de NE obtenida se sometió a los mismos tratamientos de desecación por cinco generaciones más. Los IJ de la generación F6 se consideraron como líneas de nematodos tolerantes a la desecación.

Generación de líneas de nematodos con tolerancia al calor

El procedimiento para obtener los IJ fue similar al aplicado para obtener los nematodos tolerantes a la

deseccación; los niveles de calor se aplicaron exponiendo cajas petri con agua destilada con mil IJ cada una, a 25, 30 y 35°C por 48 h. Se utilizó una cámara de crecimiento marca BOEKEL Scientific modelo 136400; al término de seis ciclos de selección, se obtuvo una línea de nematodos tolerante a temperaturas altas para cada especie de los nematodos en estudio.

Para ambos experimentos de generación de líneas tolerantes, después de transformar los datos de porcentaje de sobrevivencia de los IJ mediante la raíz cuadrada del arco seno, utilizando cinco repeticiones, se realizó el análisis de varianza (SAS, 2000). Para las comparaciones de medias de sobrevivencia a distintos niveles de A_w dentro de cada generación se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Evaluación de las líneas a baja humedad ó a alta temperatura

Para la evaluación a baja humedad, a temperatura ambiente, se añadió agua destilada a un disco de papel filtro cuantitativo Whatman No. 42 colocado en una caja petri de 90 mm diam, hasta conseguir una humedad de 17.5%, equivalente a un A_w de 0.86 (Labuza y Bell, 2000). Después se aplicaron 50 IJ y luego una larva de *P. vetula* Horn de segundo instar por caja petri. Las unidades experimentales se conformaron por grupos de 10 cajas petri.

Para evaluar la tolerancia a alta temperatura, se aplicó agua destilada suficiente para alcanzar un A_w de 1.0 a las cajas petri cubiertas con papel filtro. Se depositaron las larvas en las cajas petri de la forma descrita previamente y se colocaron en la estufa a 35°C por 3 d, al cabo de los cuales se contaron las larvas sobrevivientes.

En estos experimentos se evaluaron cuatro tratamientos: las líneas generadas de las tres especies de nematodos, más un testigo sin aplicación de nematodos con cuatro repeticiones. Durante 3 d, se contaron las larvas muertas por tratamiento. Cuando la mortalidad del testigo fue mayor del 4%, como fue en el caso de temperatura alta, se estimó la mortalidad corregida de acuerdo a Abbot (1925). Después de transformar los datos de porcentaje de control de las larvas mediante la raíz cuadrada del arco seno, se realizó el análisis de varianza (SAS, 2000) y para la comparación de medias de se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Generación de las líneas de nematodos resistentes a alta temperatura

Los IJ de las tres especies evaluadas mostraron un 100% de sobrevivencia cuando se sometieron al tratamiento de 25°C. En los tratamientos de 30 y 35°C se lograron incrementos en la sobrevivencia a medida que se avanzaba en las generaciones de las tres especies

de nematodos. Por razones de similitud en las respuestas de todos los nematodos a temperatura, solo se presentan los resultados en forma gráfica para *H. bacteriophora*.

Heterorhabditis bacteriophora

De acuerdo con los porcentajes de sobrevivencia de los IJ de este nematodo, se observó que a 35°C comenzó a adquirir tolerancia al calor desde la F3, y que al llegar a la F6 alcanzó 69.8% de sobrevivencia (Figura 1). A 30°C, el nematodo ya había alcanzado una sobrevivencia de 73% desde la F2, logrando 97.2% de sobrevivencia en la F6. En ambas temperaturas se observaron incrementos significativos ($P \leq 0.05$) en sobrevivencia a partir de la F4.

Steinernema riobrave

Para este nematodo, la evolución del incremento en sobrevivencia de la F1 a la F6 fue muy similar para 30 (72.2-41.4 = 30.8) y 35°C (47.0-19.4 = 27.6), ya que durante ese período de selección se observó un incremento promedio de 29.2 unidades porcentuales. (Cuadro 1). Con base en este porcentaje de incremento de sobrevivencia promedio, se considera que esta especie una tolerancia mediana a altas temperaturas.

Steinernema glaseri

Los IJ de este nematodo mostraron una alta sobrevivencia desde la F1, especialmente a 30°C, donde se observó una sobrevivencia del 76.6%; también para ésta temperatura, en la generación F5, ya se había alcanzado 99.00% de sobrevivencia (Cuadro 2). A 35°C, la sobrevivencia de IJ tuvo un valor de 36.00% en la F4, pero en la siguiente generación ocurrió un rápido incremento a 68.03%, terminando en la F6 con un 84.80%, la cual fue la máxima sobrevivencia observada para esta temperatura en todas las especies de nematodos bajo estudio.

Generación de líneas de nematodos tolerantes a la desecación

Como se esperaba, a valores de $A_w = 1.0$ todos los IJ de las tres especies de nematodos sobrevivieron. Al aplicar niveles de A_w de 0.97, 0.90 y 0.86 se observó que a medida que se avanzaba en las generaciones de las tres especies de nematodos, se lograron incrementos en la sobrevivencia de los IJ. Debido a la similitud en las respuestas de todos los nematodos a distintas A_w , solo se presentan los resultados gráficos para *H. bacteriophora*.

Heterorhabditis bacteriophora

En la Figura 2 se observa que en la F4, particularmente en el menor nivel de A_w , ocurrió una

disminución significativa ($P \leq 0.05$) en la sobrevivencia, la cual se atribuyó a procesos de deriva génica. También se destaca el que no se hayan obtenido sobrevivientes en las generaciones F1 y F2 a una A_w de 0.86, por lo que para producir la F2 y F3 se utilizaron IJ sobrevivientes de las F1 y F2 bajo un A_w de 0.90.

A los mayores valores de A_w (0.9 y 0.97), los valores de sobrevivencia de los IJ se incrementaron desde 18.8-25.7% en la F1 hasta 37.3-59.3% en la F6. Sin embargo para un A_w de 0.86, la sobrevivencia se mantuvo entre 19.5 y 23.6% para las generaciones F3 a F6. Los incrementos en sobrevivencia al pasar de la F5 a la F6 no fueron significativos ($P \leq 0.05$) para las A_w de 0.86 y 0-90, pero si lo fueron para la A_w de 0.97.

Steinernema riobrave

En este nematodo sí se observó sobrevivencia al A_w más bajo (0.86) desde la F1, lo cual denota una alta tolerancia a condiciones de alta presión osmótica. Sin embargo, los incrementos en sobrevivencia fueron bajos, por lo que en la F6 solo aumentó la sobrevivencia a un máximo de 33.8% en la F6, la cual no fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) a la observada en F5 (Cuadro 3). Siguiendo la misma tendencia, para valores de A_w de 0.9 y 0.97, respectivamente; la sobrevivencia de los IJ se incrementó desde 25.8-39.9% en la F1 hasta 60.3-82.4% en la F6. Para ambos niveles de A_w , los incrementos en sobrevivencia fueron significativos ($P \leq 0.05$) a partir de la F4.

Steinernema glaseri

En esta especie, no hubo sobrevivencia de IJ en la F1 y F2 a un $A_w = 0.86$, pero en la F3 la sobrevivencia fue del 20.9%, alcanzando un valor de 45.6% al llegar a la F6 (Cuadro 4). En las otras A_w aplicadas sí hubo sobrevivientes desde la F1, con valores de máximos de 72.7 y 83.37% en la F6 para las A_w de 0.90 y 0.97, respectivamente. Los incrementos en sobrevivencia de la F5 a la F6 fueron significativos ($P \leq 0.05$) para los A_w de 0.86 y 0.90, más no lo fueron para el nivel de A_w de 0.97.

Capacidad de control de larvas de *P. vetula* de las líneas generadas

Los nematodos *S. glaseri* y *S. riobrave* produjeron un porcentaje similar de mortalidad de larvas de *P. vetula* a 35°C, superando significativamente ($P \leq 0.05$) al porcentaje de control logrado con *H. bacteriophora* (24%); el testigo mostró una mortalidad baja (Cuadro 5).

El nematodo que ocasionó el mayor porcentaje de mortalidad (66.5%) a larvas de *P. vetula* a una baja actividad de agua ($A_w = 0.86$) fue *S. glaseri*, seguido por *S. riobrave* con 64.2% (Cuadro 5), pero no existieron diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0.05$). El menor porcentaje de control observado (19.4%) se

Cuadro 1. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *Steinernema riobrave* a tres temperaturas por seis generaciones sucesivas.

Generación	T (°C) ^x		
	25	30	35
F1	100 a ^y	41.4 d ^y	19.4 d ^y
F2	100 a	47.0 d	26.6 c
F3	100 a	52.2 d	27.0 c
F4	100 a	58.4 c	34.6 b
F5	100 a	65.4 b	39.6 b
F6	100 a	72.2 a	47.0 a

^xTemperatura dentro de la cámara de crecimiento.

^yMedias con distinta letra son diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *Steinernema glaseri* a tres temperaturas por seis generaciones sucesivas.

Generación	T (°C) ^x		
	25	30	35
F1	100.00 a ^y	76.60 c ^y	22.40 d ^y
F2	100.00 a	79.60 c	23.80 d
F3	100.00 a	84.64 c	31.60 c
F4	100.00 a	92.40 b	36.00 c
F5	100.00 a	99.00 a	68.03 b
F6	100.00 a	100.00 a	84.80 a

^xTemperatura dentro de la cámara de crecimiento.

^yMedias con distinta letra son diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *Steinernema riobrave* a distintas actividades de agua (A_w) por seis generaciones sucesivas.

Generación	A_w ^x		
	0,86	0,90	0,97
F1	7.83 c ^y	25.77 d ^y	39.90 e ^y
F2	23.11 b	35.49 c	51.50 d
F3	19.31 b	36.29 c	56.49 d
F4	23.28 b	33.33 c	65.00 c
F5	30.96 a	45.83 b	74.00 b
F6	33.77 a	60.29 a	82.38 a

^x Actividad del agua; la máxima actividad es de 1.0

^y Medias con distinta letra son diferentes ($P \leq 0.05$).

obtuvo con *H. bacteriophora*, el cual fue diferente ($P \leq 0.05$) a los niveles de control obtenidos para *S. glaseri* y *S. riobrave*. En este caso el testigo no fue afectado.

DISCUSIÓN

La temperatura tiene efectos importantes sobre los procesos biológicos de los NE, tales como desarrollo, tasa de respiración, sobrevivencia, dispersión, capacidad

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *Steinernema glaseri* a distintas actividades de agua (A_w) por seis generaciones sucesivas.

Generación	A_w^x		
	0,86	0,90	0,97
F1	0.00 e ^y	5.57 f ^y	18.92 e ^y
F2	0.00 e	23.66 e	31.03 d
F3	20.89 c	41.68 d	66.12 c
F4	13.99 d	58.05 c	74.58 b
F5	28.24 b	65.40 b	80.60 a
F6	45.58 a	72.70 a	83.37 a

^x Actividad del agua; la máxima actividad es de 1.0

^y Medias con distinta letra son diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Porcentajes de mortalidad de *Phyllophaga vetula* por especie de nematodo a 35°C y a una actividad del agua de 0.86.

Tratamientos	Mortalidad corregida (%)	Mortalidad (%)
	35°C	$A_w^x = 0.86$
<i>S. glaseri</i>	66.5 a ^y	28.3 b
<i>S. riobrave</i>	64.2 a	45.9 a
<i>H. bacteriophora</i>	19.4 b	42.2 a
Testigo	0.0 c	0.0 c

^x Actividad del agua; la máxima actividad es de 1.0.

^y Medias con distinta letra son diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

de búsqueda de hospederos e infectividad. La mayoría de los nematodos evaluados en el presente estudio sobrevivieron en la F1 a temperaturas de 35°C, pero *H. bacteriophora* mostró la mayor sobrevivencia (23.4%) en ésta generación. El intervalo de temperatura óptima para la actividad infectiva de *Heterorhabditis* es de 20 a 25°C, que es similar a la óptima para la actividad de IJ de otros nematodos entomopatógenos (Griffin, 1993). Nguyen y Smart (1992), encontraron que temperaturas superiores a 35 ó 37°C interrumpen su ciclo de vida, y que la temperatura óptima era de 24°C. Sin embargo, en el presente estudio, debido a la resistencia adquirida, el nematodo *H. bacteriophora* alcanzó un 69.8% de control a 35°C en la F6. De acuerdo con Selvan *et al.* (1996), los IJ de *H. bacteriophora* expuestos por 3 h a una temperatura subletal de 35°C, con un período de adaptación de 1 – 2 h a 25°C, son capaces de matar los insectos hospederos a temperaturas de 35 y 40°C, lo cual avala los resultados logrados en éste trabajo con respecto a la adquisición de tolerancia de *H. bacteriophora* a altas temperaturas.

Sin embargo, el nematodo con mayor tolerancia adquirida, tanto a bajas A_w como a alta temperatura en la F6, fue *S. glaseri*. Dada su mayor masa corporal *S. glaseri*, tiene una gran capacidad de sobrevivencia.

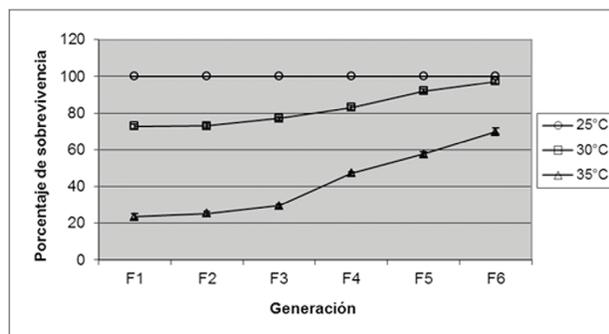


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia de *Heterorhabditis bacteriophora* a 25, 30 y 35°C.

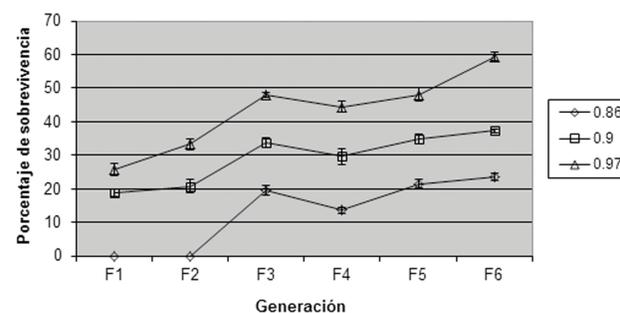


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia de *Heterorhabditis bacteriophora* a diferentes actividades de agua, A_w (0.86, 0.90 y 0.97).

Kaya (1990) menciona que más del 90% de la población de *S. glaseri* sobrevivió 32 semanas a 15°C en ausencia de un hospedero, pero a medida que la temperatura aumentó, la sobrevivencia disminuyó. Para los nematodos de la familia Steinernematidae, el límite es aproximadamente 35°C; además tienen resistencia a temperaturas inferiores a 10°C (Kaya y Gaugler, 1993).

Debido a que la mortalidad del tratamiento sin aplicación de nematodos fue menor al 10%, los efectos directos de la temperatura sobre el porcentaje de mortalidad de *P. vetula* se consideraron bajos. Morón *et al.* (1999) cultivaron cinco especies de *Phyllophaga* a una $T = 26 \pm 2^\circ\text{C}$, considerada cercana a la óptima, lo cual indica que 30°C fue una temperatura no muy alta para *P. vetula*.

A medida que se avanzó en el proceso de selección de los nematodos a diferentes A_w , se encontraron mayores porcentajes de sobrevivencia de los IJ. Sin embargo, para *H. bacteriophora* ocurrió una disminución significativa en la sobrevivencia en la F4, atribuible a procesos de deriva genética. Los efectos de la deriva se acentúan en poblaciones de tamaño pequeño, como las ocasionadas por un número reducido de sobrevivientes, con lo cual se crea un cuello de botella que resulta en una menor capacidad de adaptación a cambios ambientales (Glazer

et al., 1997).

En el presente estudio *H. bacteriophora* obtuvo una sobrevivencia de 60% con un A_w de 0.97 y de sólo 24% con 0.86 de A_w , lo cual coincide con los resultados de Forschler y Gardner (1991), quienes encontraron que *H. bacteriophora* requiere valores de A_w cercanos a 1.0 para máxima sobrevivencia, pero que a un A_w de 0.85 no sobreviven.

El nematodo *S. glaseri*, seguido por *S. riobrave*, mostró el mayor porcentaje de sobrevivencia a baja A_w , lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Brown y Gaugler (1997), quienes encontraron que la emergencia de nematodos del género *Steinernema* fue menos afectada que la de *H. bacteriophora* en condiciones de baja humedad relativa. Forschler y Gardner (1991) observaron que *Steinernema riobrave* tuvo un buen nivel de sobrevivencia a una humedad relativa baja (30%), la cual es equivalente a un A_w = 0.85.

Este resultado es diferente a lo publicado por Sosa y Hall (1989), donde *S. glaseri* presentó la mayor mortalidad a una humedad de 20%, la cual equivale a una A_w de 0.90. Shetlar *et al.* (1988) señalan un incremento en la mortalidad de *S. glaseri* cercana al 50% cuando la humedad se redujo de 40% a 25%. Jackson (2003) encontró resultados similares y menciona que los nematodos aplicados en condiciones de alta humedad permanecen más estables que en condiciones de poca humedad.

La evaluación de la resistencia adquirida utilizando larvas de *P. vetula* mostró diferencias significativas en capacidad de control de los tres nematodos a alta temperatura y baja A_w . Los nematodos con mayor porcentaje de control a alta temperatura fueron *S. glaseri* y *S. riobrave*. Al parecer la temperatura de 35°C fue muy alta para *H. bacteriophora*, ya que la temperatura óptima para la actividad de *Heterorhabditis* es de 20 a 25°C, similar a la óptima para la actividad de juveniles infecciosos de otros nematodos parásitos (Griffin, 1993).

En un estudio sobre la capacidad de control de los nematodos a alta temperatura, *S. riobrave* mostró una capacidad similar a la de *S. glaseri*. Shapiro-Llan *et al.* (2005) detectaron al nematodo *S. riobrave* como el más tolerante al calor y a deficiencias de oxígeno, mientras que los menos tolerantes fueron *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae*. Este último sólo resistió 6 h a 35°C y fue superado por varias cepas nuevas en otros estudios (Cheng y Hou, 1997; Somasekhar *et al.*, 2002). Incluso las temperaturas moderadas (25°C) han logrado eliminar a los nematodos dentro de los cadáveres de galerías después de 28 d (Gaugler *et al.*, 1997).

Los nematodos *S. riobrave* y *H. bacteriophora* mostraron una mayor capacidad para controlar las larvas de *P. vetula* a bajo contenido de humedad; para el caso de *S. riobrave* el resultado coincide con Koppenhöfer *et al.* (1995, 1997), quienes consideran que el origen y evolución del nematodo en zonas semiáridas le confiere tolerancia a condiciones de baja humedad relativa.

Para *H. bacteriophora* los resultados se contraponen a los obtenidos por Forschler y Gardner (1991) quienes encontraron una baja tolerancia de éste nematodo a bajas A_w .

En cuanto a la severidad del tratamiento de A_w aplicado, Morón *et al.* (1999) cultivaron cinco especies de *Phyllophaga* a 70 ± 5 % de HR, lo cual equivale a un A_w aproximado de 0.98, por lo que *P. vetula* estuvo sujeta a un estrés osmótico muy alto.

En resumen, el análisis de los resultados permite concluir que la exposición de los IJ a alta temperatura (35°C) incrementó significativamente la tolerancia a calor en *S. glaseri* y *H. bacteriophora*, mientras que la exposición a baja actividad del agua (A_w = 0.86) incrementó la tolerancia a la desecación de *S. glaseri* y *S. riobrave*. En la evaluación de las líneas de nematodos generadas por su capacidad para controlar larvas de *P. vetula*, *S. glaseri* y *S. riobrave* resultaron más efectivos a altas temperaturas, mientras que *S. riobrave* y *H. bacteriophora* adquirieron mayor capacidad para controlarlas a bajo contenido de humedad.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo económico de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, quién otorgó financiamiento para realizar la presente investigación (Proyecto SIP20071210).

LITERATURA CITADA

- Abbot, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Alatorre R. R. 1999. Perspectiva del uso de nematodos entomopatógenos en México. Pp. 72-77 in H. C. Arredondo, J. Molina, y V. M. Hernández, eds. Potencial de nemátodos entomopatógenos en el control de plagas, Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Alatorre R., R. y A. Guzmán Franco. 1999. Nematodos parásitos de insectos. Pp: 13-22 in H. C. Arredondo, J. Molina, y V. M. Hernández, eds. Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas. Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Bilgrami, A. L., R. Gaugler, D. I. Shapiro-Llan, and B. J. Adams. 2006. Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* during *in vivo* culture. *Nematology* 8(3):397-409.
- Brown, I. M., and R. Gaugler. 1997. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. *Nematologica* 43(5):363-375.
- Cabanillas, H. E. 1999. The entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* and its potential as biocontrol agent. Pp: 51 in Arredondo, H. C.,

- J. Molina, y V. M. Hernández, eds. Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas. Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Cheng, C. C., and R. F. Hou. 1997. Effects of environmental factors on survival of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. Chinese J. Entomol. 17:120-131.
- Forschler, B. T., and W. A. Gardner, 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) to three entomogenous nematodes. Journal of Economic Entomology 84(3):841-843.
- Gaugler, R., E. Lewis, and R. J. Stuart, 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. Oecologia 109: 483-489.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. Pp. 93-115 in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Glazer, I., L. Salame, and D. Segal. 1997. Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. Biocontrol Sci. Technol. 7(4):499-512.
- Griffin, C. T. 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: Implications for the success of biological control programmes. Pp: 115-135 in R. Beeding, R. Akhurst and H. K. Kaya, eds. Nematodes and the Biological Control of Insect Pests. CSIRO Publications, Australia.
- INEGI. 2002. Anuario Estadístico de Oaxaca 2001, tomo I y II, México, D.F. 956 pp.
- Jackson, T. A. 2003. Using entomopathogens in scarab pest Management. Pp: 333-334 in G. A. Aragón, M. A. Morón, y A. Marín J., eds. Estudios Sobre Coleópteros del suelo en América. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue., México.
- Kaya, H. K., and A. M. Koppenhofer. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology 6:357-371.
- Kaya, H. K., and R. Gaugler, 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38:181-206.
- Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K., and Taormino, S., 1995a. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. Journal of Invertebrate Pathology 65:193-199.
- Koppenhöfer, A. M., Baur, M. E., Stock, S. P., Choo, H. Y., Chinnasri, B., and Kaya, H. K., 1997. Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. Applied Soil Ecology 6:231-240.
- Labuza P., and L. N. Bell. 2000. Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. Amer. Assn. Cereal Chemists. 2nd edition. 122 p.
- Morón, M. A., S. Hernández-Rodríguez, and A. Ramírez-Campos. 1999 Description of immature stages of *Phyllophaga (Triodonyx) lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae). Pan-Pacific Entomologist 75(3):153-158
- Nguyen, K. B., and G. C. Smart, 1992. Life cycle of *Steinernema scapterici*. J. Nematol. 24 (1):160-169.
- Ruiz V. J., B. T. Aquino, y P. R. Pérez. 2003. Control integrado de gallina ciega *Phyllophaga vetula* en condiciones semicontroladas y de campo. Pp. 299-311 in G. A. Aragón, M. A. Morón y A. Marín, eds. Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- SAS. 2000. Statistical Analysis System ver. 9.0. SAS Institute, Raleigh, North Carolina, USA.
- Segal, D., and I. Glazer, 2000. Genetics for improving biological control agents: the case of entomopathogenic nematodes. Crop Protection 19:685-689.
- Selvan, S., P. S. Grewal, T. Leustek, and R. Gaugler, 1996. Heat shock enhance thermo-tolerance of infective insect-parasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). Experientia 52:727-730.
- Shapiro-Llan, D. I., R. J. Stuart, and C. W. McCoy. 2005. Characterization of biological control traits in the entomopathogenic nematode *H. mexicana* (MX4 strain). Biological Control 32:97-103.
- Shetlar, D. J., P. E. Suleman, and R. Georgis, 1988. Irrigation and use of entomogenous nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. Journal of Entomological Science 81:1388-1393.
- Somasekhar, N., P. S. Grewal, and M. G. Klein, 2002. Genetic variability in stress tolerance and fitness among natural populations of *Steinernema carpocapsae*. Biological Control 23:303-310.
- Sosa, O. Jr., and D. G. Hall. 1989. Mortality of *Ligyurus subtropicus* (Coleoptera: Scarabaeidae) in sugarcane. Environmental Entomology 14:80-82.
- Strauch, O., J. Oestergaard, S. Hollmer, and R. U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. Biological Control 31(2):218-226.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66:302-303.

Received:

3/XI/2010

Accepted for publication:

24/VIII/2011

Recibido:

Aceptado para publicación: