



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Maestría en Sanidad Vegetal

“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

Tesis de maestría

Caracterización de aislados nativos de nematodos entomopatógenos y uso potencial contra *Spodoptera frugiperda*

AUTOR:

Ing. Markelyn José Rodríguez Zamora

ASESORES:

Dra. Isabel Cristina Herrera Sirias

Dr. Arnulfo José Monzón Centeno

Managua, Nicaragua

Marzo, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
Maestría en Sanidad Vegetal

Caracterización de aislados nativos de nematodos entomopatógenos y uso potencial contra *Spodoptera frugiperda*

AUTOR:

Ing. Markelyn Rodríguez Zamora

ASESORES:

Dra. Isabel Cristina Herrera Sirias

Dr. Arnulfo José Monzón Centeno

Tesis sometida a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como requisito parcial para optar al grado de:

Maestro en Ciencia

Managua, Nicaragua

Marzo, 2019

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito parcial para optar al título profesional de:

Maestro en ciencias en Sanidad Vegetal

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Jorge Ulises Blandon Diaz
Presidente

Dr. Edgardo Salvador Jiménez Martínez
Secretario

Dr. Freddy Alemán Zeledón
Vocal

Lugar y Fecha: _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCION	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	4
2.1 General	4
2.2 Específicos	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 Ubicación del área de estudio	5
3.2 Descripción del estudio	5
3.2.1 Colecta de aislados nativos de nematodos entomopatógenos (NEP's)	5
3.2.2. Aislamiento de nematodos entomopatógenos	6
3.2.3 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos	7
3.3 Caracterización de los aislados nativos de los nematodos entomopatógenos	7
3.3.1.1. Caracterización morfológica de las bacterias simbiotes	7
3.3.1.2.1 Pruebas bioquímicas	8
3.3.1.2 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias simbiotes	10
3.4. Identificación de <i>Steinernema</i> sp y <i>Heterorhabditis</i> sp	10
3.4.1 Extracción de ADN genómico	10
3.4.1.2 Amplificación por la técnica PCR convencional	10
3.4.1.3 Caracterización de los géneros de nematodos entomopatógenos aplicando la técnica PCR-RFLP	11
3.4.1.3.1 Amplificación de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	11

3.5 Evaluación del efecto de los aislados nativos de nematodos entomopatógenos sobre (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith)	11
3.6 Análisis de datos	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Colecta de aislados nativos de nematodos entomopatógenos (NEP's)	13
4.2 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos	15
4.2.2 Emergencia de infectivos juveniles (J3)	15
4.3 Caracterización de los aislados nativos de los nematodos entomopatógenos	18
4.3.2 Aislamiento e identificación de las bacterias simbiote	20
4.3.3 Caracterización morfológica a nivel de género de las bacterias simbiotes	20
4.3.4 Pruebas bioquímicas	21
4.3.4.1 Determinación de <i>Photorhabdus</i> a nivel de subespecies	21
4.4 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias simbiote <i>Photorhabdus</i> . (<i>P. luminescens</i> subsp. <i>Akhurstii</i> , <i>P. luminescens</i> subsp. <i>Luminescens</i>)	23
4.5 Identificación del género <i>Heterorhabditis</i> sp basado en amplificación del gen 28S del ARN ribosómico	25
4.6 Identificación molecular	26
4.7 Evaluación del efecto de cuatro concentraciones de aislados nativos de <i>Heterorhabditis</i> sp sobre larvas del segundo estadio larval (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith)	27
5. Concentración letal media (CL50)	30
5.1 Aislados <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis indica</i>	30
5.2 Tiempo letal medio (TL50)	32
5.3 Aislado <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , <i>Heterorhabditis indica</i>	32
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII. LITERATURA CITADA	36
VIII. ANEXOS	45

DEDICATORIA

Dedico a Jehová, Padre celestial por darme la vida y salud por permitirme la culminación de este trabajo.

A mi hijo Markelyto José Rodríguez, por ser la razón de mi esfuerzo en esta nueva etapa de mi vida por retribuirme una nueva forma de amar.

A mi familia Jaritza Jurielka Ávila Huete, Agustina Zamora Reyes, José Santos Palma, Andy Jonathan Rodriguez Zamora, Maybelling Esperanza Rodríguez Zamora, Ana Zambrana y a Guadalupe Palma por el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante las etapas de mi vida.

A mi padrino Marcial Arauz Gonzales, Juana Aleyda Soza, Heydi Valeska Arauz Soza, Yesser Alexander Arauz Soza por todo el aprecio cariño, amor y apoyo incondicional brindado durante todas las etapas de mi vida.

Ing. Markelyn Rodriguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jehová Padre celestial por la vida y salud brindado durante la etapa de este trabajo.

A mis asesores Dra. Isabel Herrera y Dr. Arnulfo Monzón por su apoyo, paciencia y todo el conocimiento que me ha brindado durante el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Ulises Blandón Díaz, Dr. Freddy Miranda, Dr. Roldán Corrales Briceño, Dr. Guillermo Reyes Castro, MSc. Isaías Sánchez, Ing. Danesa Reynosa, Ing. Eliezer Lanuza e Ing. Santos David por su apoyo incondicional y consejos brindado durante el transcurso de este trabajo.

Al programa de Maestría en Sanidad vegetal de la Universidad Nacional Agraria y equipo de docentes que forman parte de la maestría.

Al cuerpo colectivo de Docentes del Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) de la Facultad de Agronomía por sus consejos brindados, amistad durante el transcurso de este trabajo

Ing. Markelyn Rodriguez

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Zonas agroecológicas muestreadas para la colecta de aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos	6
2	Caracteres fenotípicos utilizados en la diferenciación de las especies de las bacterias simbiotes	9
3	Pruebas bioquímicas realizada la determinación de las especies de bacterias simbiotes	9
4	Localidades y cultivos donde se aislaron cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP's)	13
5	Valores promedios de infectivos juveniles (J3) evaluados a las 24, 48, 72, 96 horas a temperatura ambiente	16
6	Resultado de las características culturales, fisiológicas de <i>Photorhabdus</i> sp (Akhurst y Boemare, 1993)	21
7	Caracterización de las especies, la que estuvo basada en la capacidad para oxidación de dos hexosas alcohólicas (Inositol, manitol)	22
8	Evaluación de la patogenicidad de los aislados <i>P. luminescens</i> subsp. <i>Akhurstii</i> , <i>P. luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i> a una concentración 1×10^8 UFC	24
9	Efecto de cuatro concentraciones de <i>Heterorhabditis</i> sp sobre larvas (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith)	28
10	CL ₅₀ valores obtenidos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis indica</i> sobre larvas (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith). Aislado Nic-1, aislado St, aislado Sm-2, aislado Nic-9	31
11	TL ₅₀ valores obtenidos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis indica</i> sobre larvas (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith). Aislado Nic-1, aislado St, aislado Sm-2, aislado Nic-9	32

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Colecta de aislados Nativos de Nematodos Entomopatógenos (A) <i>Heterorhabditis</i> sp, (B) <i>Steinernema</i> sp (UNA. Managua 2015)	14
2	Emergencia de infectivos juveniles (J3) evaluados a las 24, 48, 72, 96 horas a temperatura ambiente	17
3	Primera generación de <i>Heterorhabditis</i> sp, desprendimiento de la doble cutícula, cabeza redondeada. B macho completo y aparato reproductor. C esófago y labios. D. hembra completa con huevos en su interior	18
4	Primera generación de <i>Steinernema</i> sp Endotoquia Matricida, B. tapon vulvar, C. espícula de un macho de Primera generacion, D, Primera generacion produccion en medio solido base agar perro	19
5	Colonias características de <i>Photorhabdus</i> sp en medio agar nutriente (A. fase I y B. fase II)	20
6	Prueba de Lipasa y Proteasa positiva en medio Luria Broth (LB)	22
7	Evaluación de la patogenicidad de los aislados, <i>P. luminescens</i> subsp. <i>Akhurstii</i> , <i>P. luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i> a una concentración 1×10^8 UFC	24
8	Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de amplificación del gen ribosomal 28S de nemátodos entomopatógenos. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Carril 2: Control negativo, Carril 3: Nic1, Carril 4, 6: Sm2, Carril 5: Nic9, Carril 7: St, Carril 8: control CR-9	25
9	Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de la digestion enzimática Alu 1 del gen 28S de <i>Heterorhabditis</i> , la letra PM indica Marcador de peso molecular, Carril 2: <i>H. indica</i> (St), Carril 3: <i>H. bacteriophora</i> (Nic1), Carril 4: <i>H. bacteriophora</i> (Sm 2), Carril 5: <i>H. bacteriophora</i> (Nic 9), Carril 6: control <i>H. Indica</i> (CR9)	27
10	Efecto de cuatro concentraciones de <i>Heterorhabditis</i> sp sobre larvas (L2) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith). Asilado Nic-1, aislado St, asilado Sm-2, aislado Nic-9	29

ÍNDICE DE ANEXOS

FIGURA

1 Protocolo de extracción de ADN bacterianos

PÁGINA

45

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos constituyen un grupo de organismos con mucho potencial como agentes de control biológico de plagas de importancia económica, por su amplio rango de huéspedes, habilidad de búsqueda y la rapidez con que causan la muerte, principalmente de plagas de suelo. El objetivo de esta investigación fue caracterizar y evaluar el potencial de aislados nativos de nematodos entomopatógenos, para el control de plagas. Se seleccionaron cinco fincas localizadas en diversas zonas agroecológicas de donde se obtuvo un total de 85 muestras de suelo para la colecta de nematodos entomopatógenos. Para el aislamiento de los nematodos se utilizó la técnica de insecto cebo, utilizando larvas de *Galleria mellonella*. La identificación morfológica de nematodos se basó en caracteres morfológicos de adultos, considerando: papilas labiales cefálicas, genitales, estriaciones longitudinales. La caracterización e identificación molecular se realizó a través de PCR-RFLP basada en la región gen ARNr 28S. Las bacterias simbiotes fueron identificadas mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. Para la evaluación de la efectividad de los aislados se utilizó la CL₅₀ y el TL₅₀. Se identificaron y caracterizaron cuatro aislados nativos de especies de nematodos entomopatógenos, además se evaluó su uso potencial en el control de plagas insectiles como *Spodoptera frugiperda*. Los resultados indican que en el 13% se registró la presencia de nematodos entomopatógenos. La identificación morfológica y molecular reveló la presencia *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*. Las pruebas bioquímicas y morfológicas revelaron la presencia de *Photorhabdus luminescens*. Los aislados de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica*, causaron el 65% de mortalidad a las 48 horas a una concentración de 40 y 170 infectivos juveniles respectivamente. La CL₅₀ más baja se encontró con *Heterorhabditis indica* y la más alta con *Heterorhabditis bacteriophora*. El aislado *Heterorhabditis bacteriophora* resultó efectivo para el control de *Spodoptera frugiperda* y podría ser considerado una alternativa para ser incorporada en el manejo integrado plagas.

Palabras claves: CL₅₀, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, *Photorhabdus luminescens*, *Spodoptera frugiperda*, TL₅₀

ABSTRACT

The entomopathogenic nematodes constitute a group of organisms with great potential as agents of biological control of economic importance pests, due to their wide range of hosts, search ability, and the rapidity with which they cause death, mainly soil pests for such reason the objective of this research was to characterize and evaluate the potential of native isolates of entomopathogenic nematodes, for the control of pests. Five farms located in different agro-ecological zones were selected from which a total of 85 soil samples were collected for the sample of entomopathogenic nematodes. For the nematode isolation, the bait insect technique was used, using *Galleria mellonella* larvae. The morphological identification of nematodes was based on morphological characters of adults, considering: cephalic labial papillae, genitals, longitudinal striations. The molecular identification was performed through PCR-RFLP based on the 28S rRNA gene region. Symbiotic bacteria were identified by morphological and biochemical tests. The LC_{50} and the TL_{50} were used to evaluate the effectiveness of the isolates. Native isolates of entomopathogenic nematode species were identified and characterized, and their potential use in the control of insect pests, such as *Spodoptera frugiperda*, was also evaluated. The results indicate that the presence of entomopathogenic nematodes was recorded in 13% of the samples obtained from soil. The morphological and molecular identification revealed the presence of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Heterorhabditis indica*. Biochemical and morphological tests for symbiotic bacteria revealed the presence of *Photorhabdus luminescens*. The isolates of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Heterorhabditis indica*, caused 65% mortality at 48 hours at a concentration of 40 and 170 infective juveniles, respectively. The lowest LC_{50} was found with *Heterorhabditis indica* and the highest with *Heterorhabditis bacteriophora*. The isolates of *Heterorhabditis bacteriophora* was effective for the control of *Spodoptera frugiperda* and should be considered as an alternative to be incorporated into integrated pest management.

Key Words: CL_{50} , *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, *Photorhabdus luminescens*, *Spodoptera frugiperda*, TL_{50}

I. INTRODUCCION

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* Travassos y *Heterorhabditis* son parásitos obligados de insectos e infectan una gama amplia de insecto que viven en el suelo (Kaya and Gaugler, 1993). Asu vez estos nematodos están asociados mutuamente con bacterias del genero *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* (Boemare *et al.*, 1997). Las cuales requieren de este hospedero para obtener proteccion y lograr diseminarse de un insecto a otro (Liu *et al.*, 2000).

El daño causado por plagas insectiles es uno de los principales factores que conducen a la reducción de la producción de los principales cultivos (Oliveira *et al.*, 2014). Estas pérdidas se registran en los 35 principales cultivos entre el 2 y 43%, estimando que los insectos causan pérdidas de un 7,7 % generando un costo anual de aproximadamente US \$ 14.700 millones para la economía (Bento, 1999; Goellner, 1993).

En Centro América no existen estimaciones confiables de pérdidas en los rendimientos para toda la región, sin embargo, la productividad de los cultivos destinados al consumo humano está en riesgo debido a la incidencia de plagas (MAGFOR, 2008) y su manejo se caracteriza por el uso excesivo de plaguicidas.

A nivel nacional en el 2009 se importaron 63.8 millones de dólares en agroquímicos, el 88 por ciento de los productores usan pesticida para el control de plagas insectiles y solo un 8 por ciento usa otro tipo de control de plagas convirtiendo a Nicaragua en un país con una de las tasas más altas de uso de plaguicidas con respecto a países en desarrollo (MAGFOR, 2008).

Entre los insecticidas más usados para control plagas insectiles podemos encontrar, los órganoclorados, carbamatos, organofosforado, piretroides, tricarbamatos (Berny, 2007), los que presentan compuestos persistentes afectando la biota y el ser humano (Baird, 2001).

La evolución natural de los sistemas de producción agraria ha derivado en los últimos años hacia métodos de control de plagas y enfermedades más racionales y respetuosas con el medio

ambiente y de hecho amigable con la filosofía de desarrollo sustentable (Badii, 2004; Badii & Abreu, 2006a, b; Badii & Ruvalcaba, 2006).

La incorporación de agentes biológicos para la regulación de insectos y otros organismos plagas se hace cada día más urgente (Sáenz, 2005) por lo que ha cobrado mayor importancia durante las últimas décadas el estudio de los nematodos entomopatógenos, los cuales son considerados una alternativa promisoriosa en el control de plagas agrícolas (Kaya y Gaugler, 1993).

Los nematodos entomopatógenos son parásitos obligados de insectos, encontrándose naturalmente en el suelo con una distribución ubicua y se utilizan como agentes de control biológico. Las dos familias más importantes y estudiadas son *Steinernematidae* la cual está asociada con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Heterorhabditidae* que establecen su relación con bacterias del género *Photorhabdus* (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estudios realizados en condiciones de invernadero con *Heterorhabditis spp.* para el control de larvas de *Phyllophaga elenans* en el estadio L2 y L3 registró un 50% de mortalidad utilizando una dosis de 481 nematodos por larva (Rodríguez *et al.*, 2009). Así mismo este mismo género se evaluó para el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones *in vitro* comprobando que el nematodo es capaz de infectar y matar a los estadios larvales más desarrollados (L5) (Rodríguez *et al.*, 2015; Amador *et al.*, 2015).

Estudios realizados por (Morales, 2012), evaluando a *Heterorhabditis bacteriophora* para el manejo de picudo plátano, encontró que la dosis letal media fue de 1220.4 nematodos por larva. De igual forma los géneros *Rhabditis* y *Heterorhabditis* se evaluaron en larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Diaphania hyalinata* y *Plutella xylostella* encontrándose mortalidad del 90 por ciento para ambos géneros (Melo-Molina, *et al.*, 2007).

En Nicaragua no ha sido documentado el uso de los nematodos entomopatógenos, sin embargo, el género *Heterorhabditis spp.*, ha sido utilizado exitosamente en el manejo de las principales

plagas de suelo en el cultivo de caña azúcar, como *Phyllophaga sp*, *Elateridae sp* y *Castnia sp*,¹ sin embargo es importante mencionar que las cepas utilizadas han sido introducidas al país. Tomando en consideración las pérdidas que causan las plagas a los cultivos y los costos que causan a la economía nacional, este estudio tiene como propósito contribuir al desarrollo de una alternativa de manejo biológico de las importantes plagas de suelo que afectan a los cultivos, permitiendo además la reducción del uso de insecticidas sintéticos altamente peligrosos para la salud humana y el medio ambiente.

¹Flores V. 2017 Ing. Agrónoma, Ingenio Monte Rosa

II. OBJETIVOS

2.1 General

Contribuir al desarrollo de opciones de manejo de plagas insectiles a través del uso de cepas nativas de nematodos entomopatógenos que permita un incremento de la producción y conlleve la reducción del uso de insecticidas sintéticos altamente peligrosos para la salud humana y el medio ambiente.

2.2 Específicos

- Determinar la presencia de aislados nativos de nematodos entomopatógenos en diferentes zonas agroecológicas de Nicaragua.
- Identificar aislados nativos de especies de nematodos entomopatógenos mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.
- Evaluar el efecto de las especies de nematodos entomopatógenos identificados sobre segundo instar de *Spodoptera frugiperda* como una alternativa sostenible.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de cría de parasitoides del departamento de protección agrícola y forestal (DPAF) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicado en el km 12 ½ carretera norte, la cual está localizado a una latitud 12°08' norte, longitud de 86°10' oeste a una elevación de 56 msnm.

3.2 Descripción del estudio

El tipo de estudio fue de tipo cuantitativo, consistió en la colecta y evaluación de aislados nativos de nematodos entomopatógenos y se realizó en dos etapas. La primera consistió en la colecta de muestras de suelo para la extracción de aislados nativos.

La segunda etapa se realizó a nivel de laboratorio y consistió en la evaluación de los nematodos entomopatógenos aislados en la primera etapa para determinar su patogenicidad sobre el segundo instar de *Spodoptera Frugiperda* (Smith) con el objetivo de contribuir al desarrollo de opciones de manejo de plagas insectiles

3.2.1 Colecta de aislados nativos de nematodos entomopatógenos (NEP's)

Se colectaron un total de 85 muestras de suelo procedentes de siete fincas en diferentes zonas agroecológicas de Nicaragua, utilizando el método intensivo (Bedding y Akhurst, 1975) (Cuadro 1).

Cada muestra de suelo consistió en 15 submuestras las cuales fueron colectadas al azar, con un barreno graduado a una profundidad de 15 centímetros. El suelo colectado se depositó en bolsas plásticas las cuales se etiquetaron y se trasladaron al laboratorio de cría de parasitoides del departamento de protección agrícola y forestal (DPAF-UNA).

Cuadro 1. Zonas agroecológicas muestreadas para la colecta de aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos.

Departamento	Municipio	Hábitats
Jinotega	Santa Martha	Cultivo de café orgánico
Chinandega	San Carlos	Cultivo Caña azúcar
	San José	Cultivo Caña azúcar
	Santa María	Cultivo Caña azúcar
Rivas	Los Ángeles	Cultivo cítricos
	San Martín	Silvo pastoril
	Los Chiles	Plantación forestal

3.2.2. Aislamiento de nematodos entomopatógenos

El suelo obtenido en el campo se homogenizó y tamizó, después de lo cual se tomó 900 gramos de suelo con 70% de humedad y se colocaron en vasos de vidrio de 900 cm³. Para el aislamiento de nematodos entomopatógenos se utilizaron larvas de *Galleria mellonella*, según el método insecto trampa (Bedding y Akhurst, 1975.; Zimmerman, 1986). En cada vaso se colocaron cinco larvas del último instar larval de *G. mellonella*. Los vasos se sellaron y se invirtió su posición con el objetivo de inducir movilidad en las larvas para aumentar la probabilidad de contacto con los nematodos.

Las submuestras de cada finca se mantuvieron en un cuarto oscuro a 28⁰C por un período de 10 días. Las observaciones del estado de las larvas se realizaron cada 24 horas para determinar la mortalidad de larvas o la presencia de síntomas causados por los nematodos entomopatógenos. Las larvas que estaban muertas y presentaban un olor fétido, fueron descartadas (Rosa *et al.*, 2000; Stock, 2008).

Las larvas que presentaron síntomas de infección causada por los nematodos entomopatógenos se esterilizaron con alcohol histológico al 95% durante 5 segundos y se colocaron individualmente en trampas White modificada por Kaya y Stock (1997), posteriormente, las trampas se colocaron en la oscuridad y se revisaron diariamente durante diez días hasta la

emergencia de los nematodos. La solución de nematodos se colectó y se guardó en una botella de 10 ml, previamente etiquetada con su procedencia, a 8°C en una refrigeradora.

3.2.3 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos

Las larvas de *G. mellonella* fueron inoculadas con los nematodos entomopatógenos, utilizando el método tópico y el método de inmersión. El método de inmersión consistió en sumergir por cinco segundos 30 larvas de *G. mellonella* contenidas en una malla, en una concentración 8,000 infectivos juveniles en un litro de agua. Luego se depositaron en un tamiz para eliminar el exceso de agua e inmediatamente las larvas de *G. mellonella* se colocaron en trampas White para obtener la emergencia de los nematodos (Kaya y Stock, 1997).

En el caso del método tópico las larvas de *G. mellonella* se colocaron en una bandeja con papel filtro y mediante una pipeta se aplicaron 5 ml de la concentración de nematodos. Posteriormente a las 72 horas las larvas se depositaron en las trampas White (Kaya y Stock, 1997). Las larvas de *G. mellonella* permanecieron en las trampas White por un período de 96 horas y cada 24 horas se contabilizó la cantidad de infectivos juveniles emergidos en los dos métodos evaluados.

3.3 Caracterización de los aislados nativos de los nematodos entomopatógenos

La identificación a nivel de género de los nemátodo entomopatógenos se realizó mediante caracteres morfológicos tales como la pigmentación de las larvas infectadas (coloración que forma) textura de la larva (flácidas o turgentes), forma del esófago, numero de papilas labiales, cefálicas y genitales en machos, estriaciones longitudinales, fasmidios en las formas infectivos juveniles observándose directamente en el microscopio de disección basándose en las características morfológicas según Nguyen *et al.*, (2007).

3.3.1.1. Caracterización morfológica de las bacterias simbiotes

Las bacterias simbiotes fueron identificadas a nivel de género mediante pruebas bioquímicas. Se tomaron 1250 µl de la solución de nemátodos entomopatógenos obtenidos y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.25 ml., posteriormente se centrifugó por dos minutos a 1400 rpm con el fin de concentrar a los nemátodos. Este proceso se repitió dos veces más, hasta lograr tener la

mayor cantidad de nemátodos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 250 µl de cloro al 1%, la cual fue agitada en el vórtex por un minuto, posteriormente se centrifugó a 1400 rpm por un minuto. Una vez que se descartó el sobrenadante se le realizaron dos lavados con agua estéril, centrifugándose a 1400 rpm por un minuto.

Para obtener las bacterias simbiotes los nematodos fueron depositados en un mortero, se le agregó 250 µl del medio Caldo Luria Bertani (LB) para su maceración. Del macerado obtenido se tomaron 100 µl, y se sembraron por agotamiento en tres tipos de medios: Agar nutriente, Agar Mc Conkey y NBTA (Agar nutriente suplementado con 0.004% de cloruro de trifeniltetrazolio y 0.025% de bromotimol azul). Estos medios fueron utilizados para caracterización morfológica de las bacterias simbiotes.

Para cada uno de los aislados se hicieron tres repeticiones de cada medio y se incubaron por 48 horas a una temperatura de 30°C y 40°C. Se seleccionaron las colonias que presentaron pigmentación amarilla (agar nutriente), púrpura (NBTA) y rosa (MacConkey) y se aislaron en un cultivo puro. El propósito de utilizar dichos medios fue para determinar los géneros de los simbiotes de los aislados nativos.

3.3.1.2.1 Pruebas bioquímicas

Una vez determinados los géneros de las bacterias simbiotes de cada aislado de nemátodos, se cultivaron en medio de agar nutriente para ser utilizada en las pruebas bioquímicas.

La prueba bioquímica consistió en la oxidación de dos hexosas alcohólicas (dulcitol y manitol), utilizando como medio base (3 g agar-agar, 1 g NH₄H₂PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g MgSO₄7H₂O, 0.1 g peptona, 0.03 g azul bromotimol y 1000 ml agua destilada) más carbohidratos al 10%.

Se vertieron 4.5 ml del medio base en tubos de ensayo estériles, a cada tubo se le agregó 0.5 ml de carbohidratos al 10%. En cada tubo se inoculó por punción la simbiote. Esta prueba se repitió con el fin de confirmar los resultados. Para la identificación de las especies se utilizó como referencia la metodología de Koppenhöfer (2007) (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Caracteres fenotípicos utilizados en la diferenciación de las especies de las bacterias simbioses.

Características	1	2	3	4	5	6
Temperatura máxima de crecimiento °C	37-38	40	38-39	38-39	35-36	35-36
Bioluminiscencia	+	+	+	+	+	+
Producción de antimicrobianos	-	-	+	+	nr	+
Producción Índole	-	-	+	+	-	+
Citrato (Simmons)	+	d	+	d	+	d
Urease	+	-	-	d	w	+
Hidrolisis Esculina	+	+	+	+	+	+
Lectinasa (yema de huevo)	-	-	+	+	nr	+
Lipasa (Tween 80)	+	-	+	+	+	+
ADNasa	+	-	-	-	+	+
Oxidación de alcoholes						
Inositol	Dw	d	+	+	-	-
Mannitol	-	-	dw	+	-	-

nr (no reportado), d (positivo 26-75%), w (reacciona a la semana), dw (positivo).

Photorhabdus asymbiotica subsp asymbiotica, ² *Photorhabdus asymbiotica subsp australis*, ³ *Photorhabdus luminescens*, ⁴ *Photorhabdus luminescens subsp akhurstii*, ⁵ *Photorhabdus luminescens subsp kayaii*, ⁶ *Photorhabdus luminescens subsp laumondii*.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas realizadas la determinación de las especies de bacterias simbioses.

Actividad	Medio utilizado	Resultados esperados
Proteasa	Agar gelatina	+ / -
Lipasa	Agar nutriente suplementado con Tween 20	+ / -
	Agar nutriente suplementado con Tween 20	+ / -
Lectinasa	agar nutriente suplementado con yema de huevo al 10 %	+ / -
Actividad microbiana	Agar nutriente	+/-
Bioluminiscencia	Agar nutriente	+ / -

3.3.1.2 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias simbiotes

Las bacterias simbiotes identificadas fueron cultivadas en caldo LB durante 48 horas a 28-40°C. Pasado este tiempo la solución obtenida fue centrifugada a 12000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue inoculado en larvas de *G. mellonella*, a una concentración de 1×10^4 . Se inocularon 25 larvas de *G. mellonella* con tres réplicas, se mantuvieron a temperatura ambiente, realizándose una lectura a las 24 horas.

Se realizó un bioensayo con el propósito de evaluar la patogenicidad de los aislados bacterianos, en el cual las bacterias se cultivaron en caldo LB durante 48 horas a 28°C y luego se centrifugó el caldo a 12000 rpm con el fin de cosechar el sobrenadante. Posteriormente 10 µl del sobrenadante del cultivo se inyectó en el hemocele de *G. mellonella* usando una micro jeringa de 10 µl. Cada larva inoculada se transfirió a un plato Petri de 90 mm, se incubó a 25°C con una humedad relativa del 70%. La tasa de mortalidad se evaluó cada 24 horas, evaluándose 25 larvas por placa petri.

3.4. Identificación de *Steinernema* sp y *Heterorhabditis* sp

3.4.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de los nematodos entomopatógenos se utilizaron 50 nematodos siguiendo el protocolo de Stock (2008) (Anexo 1).

3.4.1.2 Amplificación por la técnica PCR convencional

La identificación de los nematodos entomopatógenos a nivel de género se realizó mediante la técnica de PCR convencional con reacciones de 25 µl de volumen final, la que consistió en mezclar 2 µl de la muestra a estudiar, 12.5 µl de Máster Mix (PROMEGA), 7.5 µl de agua libre de nucleasas y el par de iniciadores 391 delantero (5´AGCGGAGGAAAAGAACTAA3´), 501 reverso (5´TCGGAAGGAACCAGCTACTA3´) diseñados por Powers *et al.*, (1997).

El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 45 segundos, 45 ciclos a 95°C por 45 s, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 1 minuto. Para visualizar los

fragmentos se colocaron 8 µl. Del producto PCR con 2 µl del colorante de carga 6x en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red. La electroforesis se llevó a cabo por espacio de una hora a 80 voltios y luego se procedió a visualizar en el transluminador y posteriormente se registraron los resultados fotográficamente.

3.4.1.3 Caracterización de los géneros de nematodos entomopatógenos aplicando la técnica PCR-RFLP

3.4.1.3.1 Amplificación de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La identificación a nivel de especie de los nematodos entomopatógenos se realizó mediante la técnica PCR-RFLP usando el producto de la amplificación de la PCR con los iniciadores reverso 501 R y delantero 391 F. Los productos de ADN de la región del gen ARNr 28S amplificada fueron digeridos por la enzima de restricción *AluI* de acuerdo con el protocolo del fabricante (Corporación PROMEGA).

El producto de la PCR se sometió a digestión con la enzima *AluI* en un volumen final de 10 µL. El procedimiento consistió en adicionar 5 µl de producto amplificado PCR, 2 µl de la enzima de restricción y 3 µl de agua libre de nucleasas (Corporación PROMEGA). Posteriormente se incubó a 37°C por una hora para después de la incubación se procedió a realizar la separación de los fragmentos en un gel de agarosa al 1.1% en solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) buffer 1X (Stock *et al.*, 1999).

3.5 Evaluación del efecto de los aislados nativos de nematodos entomopatógenos sobre (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith)

El estudio consistió en la evaluación de cuatro concentraciones de infectivos juveniles (J3) de nematodos entomopatógenos más un testigo sobre larvas de *S. frugiperda* en el estadio L2. Se hicieron para cada concentración cinco repeticiones y cada una estaba constituida por un plato petri con cinco larvas de *S. frugiperda*.

Las concentraciones consistieron de 20, 40, 80 y 170 nemátodos/larva, en el caso del testigo se utilizó agua destilada. A las 5 larvas de *S. frugiperda* y en cada repetición se le inocularon 2 ml de cada concentración, las cuales estaban ubicadas sobre una mesa a temperatura ambiente y se hicieron lecturas cada 24 horas por un período de 5 días. La variable evaluada fue mortalidad de las larvas. Para corroborar que las larvas de *S. frugiperda* fueron muertas por los nematodos se colocaron en trampas White. Mediante el uso del microscopio óptico se verificó la presencia de nematodos entomopatógenos en las larvas.

3.6 Análisis de datos

En la identificación de los nematodos entomopatógenos se llevó a cabo un análisis descriptivo de su morfología como son las papilas labiales, cefálicas y genitales en machos, estriaciones longitudinales, fasmidios en las formas infectivos juveniles observándose directamente en el microscopio.

Antes del análisis, los datos de mortalidad fueron transformados mediante corrección de Abbott y se analizaron en el programa INFOSTAT versión 9.1. Para la prueba del efecto de los nematodos sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* se evaluó el porcentaje de mortalidad mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los datos para determinar la concentración letal media (CL_{50}) fueron analizados utilizando metodología probit recomendado por Bliss, (1934) analizando los datos en el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1. El tiempo letal medio se obtuvo mediante análisis probit utilizando las TL_{50} encontradas en el programa SAS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Colecta de aislados nativos de nematodos entomopatógenos (NEP's)

De las 85 muestras colectadas se obtuvieron 11 aislados de nematodos entomopatógenos (NEP's), lo que representan el 13% de las muestras analizadas, los cuales fueron encontrados en dos zonas agroecológicas. En la localidad Santa Martha, solamente se registró un aislado. El mayor número de aislados registrados son provenientes de la localidad Gaspar, El Naranjal, Cárdenas, Las Vueltas, en el cual se obtuvieron 10 aislados de 45 muestras colectadas. Es importante mencionar que de los 11 aislados 9 fueron obtenidos del departamento de Rivas. De las muestras obtenidas del departamento de Chinandega no se obtuvo nematodos (Cuadro 4) (Figura 1).

Cuadro 4. Localidades y cultivos donde se aislaron cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP's)

Localidad	Cultivos	Muestra positiva	Código de cepa
Los Angeles	Citricos	0	-
Los Angeles	Citricos	1	Sm-4
Gaspar	Silvopastoril	2	Nic-4, Nic-5
El Naranjal	Silvopastoril	1	Sm-3
Cárdenas	Barbecho	1	Sm-5
Las Vueltas	Barbecho	4	Nic-9, Nic-1, Nic-8 Nic-7
Los Chiles	Barbecho	1	Sm-6
Las Lajas	Caña de azúcar	0	-
San Carlos	Caña de azúcar	0	-
San José	Caña de azúcar	0	-
Santa Martha	Café organico	0	-
Santa Martha	Café organico	1	St
Santa Martha	Café organico	0	-
Santa Martha	Café organico	0	-



Figura 1. Colecta de aislados Nativos de Nematodos Entomopatógenos (A) *Heterorhabditis* sp, (B) *Steinernema* sp (UNA. Managua 2015).

Estudios realizados por Hazir *et al.*, (2003) sugieren que los NEP's tienen una amplia distribución y que su presencia está determinada por las condiciones específicas del lugar en donde fueron registradas. Por otro lado, Hazir *et al.*, (2003); y Rosa *et al.*, (2000), indican que no hay tendencias claras sobre la presencia de NEP's relacionada a temperatura de suelo, tiempo de muestreo, pH o materia orgánica. Los resultados del estudio coinciden con los resultados anteriores, ya que los once aislados obtenidos provienen de áreas con diferentes condiciones, en el caso de Jinotega, el aislado encontrado proviene de un área cultivada con café y sin ningún manejo y para el caso de Rivas, los nueve aislados fueron obtenidos de un área silvopastoril. Así mismo es importante mencionar que el tipo de suelo para ambas localidades fue diferente. La incidencia de nematodos entomopatógenos no hace referencia a un tipo de suelo específico o tipo de manejo en particular Stock *et al.*, (1999).

4.2 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos

4.2.2 Emergencia de infectivos juveniles (J3)

Hubo diferencias significativas ($P= 0.0002$) en la emergencia de los infectivos juveniles (J3) evaluados a las 24, 48 y 72 horas, no así a las 96 horas (Figura 2) (Cuadro 5).

El aislado Nic-1 (*Heterorhabditis* sp) fue el que presentó mayor emergencia de J3 a las 72 horas con 790 infectivos juveniles J3, cabe mencionar que el aislado St (*Heterorhabditis* sp) presentó promedios de emergencia relativamente bajas a las 24 y 48 horas sin embargo su emergencia se incrementó significativamente conforme avanzó el tiempo a las 72 y 96 horas. El aislados Sm-2 (*Heterorhabditis* sp) a pesar de que su promedio de emergencia fue relativamente bajo en comparación con los aislados (Nic-1, St,) la emergencia de los infectivos juveniles J3 fue incrementándose a través del tiempo. El aislado Nic-9 (*Heterorhabditis* sp) fue muy similar y su porcentaje de emergencia fue relativamente baja (Figura 2) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores promedios de infectivos juveniles (J3) evaluados a las 24, 48, 72, 96 horas a temperatura ambiente

Aislados	Horas evaluadas											
	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas		
	J3	Tukey ($\alpha=0.05$)	P	J3	Tukey ($\alpha=0.05$)	P	J3	Tukey ($\alpha=0.05$)	P	J3	Tukey ($\alpha=0.05$)	P
Nic-1	579.1	a	0.22	776.6	a	0.0006	790.6	a	0.028	669.6	a	0.028
St	252.6	ab	0.22	175.4	c	0.0006	558.3	ab	0.028	587.5	a	0.028
Nic-9	221.6	ab	0.22	515.3	b	0.0006	342.4	b	0.028	488.1	a	0.028
Sm-2	179.7	b	0.22	383.5	cb	0.0006	300.3	b	0.028	540.8	a	0.028

*Letras distintas significan diferencias significativas dentro de cada columna, según Tukey ($\alpha = 0.05$).

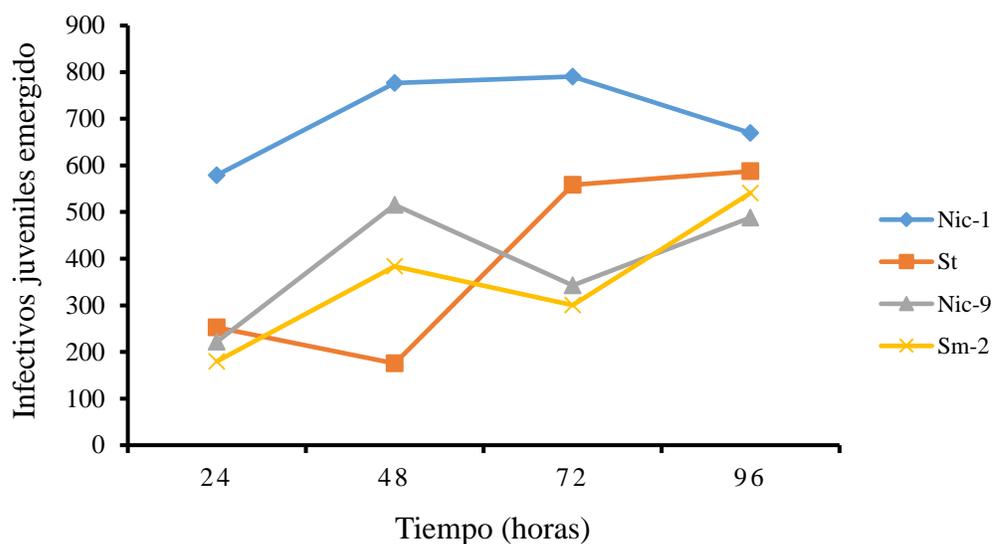


Figura 2. Emergencia de infectivos juveniles (J3) evaluados a las 24, 48, 72, 96 horas a temperatura ambiente.

Los resultados del presente estudio indican que el promedio de emergencia de J3 fue variable para cada uno de los aislados, en el caso del aislado St la emergencia se incrementó a las 48 horas y para los aislados Nic 9 y Sm 2 se incrementó a partir de las 72 horas, esto probablemente se debe a la biología de los aislados los cuales se desarrollan hembras y machos durante la segunda generación lo que concuerda con lo encontrado con Realpe-Aranda *et al.*, (2007), Ortiz *et al.*, (1994). Así mismo Realpe-Aranda *et al.*, (2007) reporta que la producción de J3 es 3,681 y en el caso de nuestro el valor obtenido son de aproximadamente 790 J3. Por otro lado, Shapiro-Illan y R Gaugler, (2002) indica que el rendimiento en la producción in vivo depende de la dosis de infectivos juveniles dentro del huésped maximizando la sobrevivencia y fecundidad de los nematodos. Lo cual en los aislados ensayados probablemente obedezca a una ¹peculiaridad de los aislados en si al ser afectados por la temperatura, humedad, aireación factores que afectan el rendimiento.

¹Arnulfo J. Monzón PhD Universidad Nacional Agraria

4.3 Caracterización de los aislados nativos de los nematodos entomopatógenos

Los 11 aislados obtenidos se agruparon en dos géneros, *Heterorhabditis* sp y *Steinernema* sp. Las larvas de *G. mellonella* infectadas con el género *Heterorhabditis* sp se presentaron de consistencia turgente, de color rojo vino, bioluminiscente en oscuridad, los infectivos juveniles emergieron en un periodo de 11 a 14 días, j3 se caracterizó por presentar doble cutícula. Observándose generaciones hermafroditas y anfimicas reportado por Kaya y Gaugler, 1993. Los adultos de *Heterorhabditis* se caracterizaron por presentar una cutícula lisa, cabeza redondeada, estoma corta y Las Hembras de primera generación poseían una gran cantidad de huevos, vulva prominente conteniendo muchos huevos en su interior, así mismo observándose nematodos en formación (Figura 3).

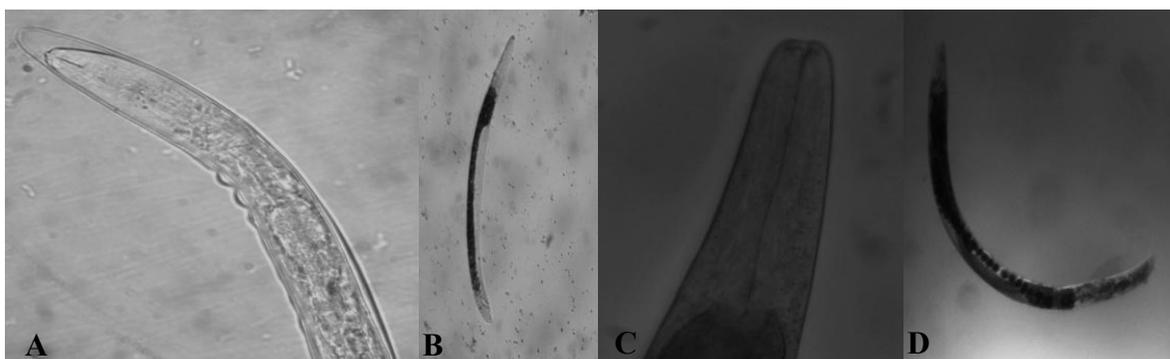


Figura 3. A. Primera generación de *Heterorhabditis* sp, desprendimiento de la doble cutícula, cabeza redondeada. B macho completo y aparato reproductor. C esófago y labios. D. hembra completa con huevos en su interior

Las larvas de *G. mellonella* infectadas con el género *Steinernema* se presentaron de consistencia flácida, de color café cremoso, los infectivos juveniles emergieron en un periodo de 8 a 9 días observándose solamente generaciones anfimicas, de acuerdo con la descripción del género y característica de *Steinernema* sp los cadáveres no presentaron fetidez ni pudrición, relacionado a esto la función de la bacteria simbiote de segregar antibióticos que inhiben el crecimiento de organismos antagonistas Boemare, (2002). Adultos de *Steinernema* sp se caracterizaron por presentar una cutícula lisa, cabeza redondeada, estoma corta y Las hembras se observaron de primera generación poseían una gran cantidad de huevos, vulva prominente conteniendo muchos huevos en su interior, así mismo observándose nematodos en formación (Figura 4).



Figura 4. A. Primera generación de *Steinernema* sp Endotoquia Matricida, B. tapon vulvar, C. espicula de un macho de Primera generacion, D, Primera generacion produccion en medio solido base agar perro

En el género *Heterorhabditis* sp se observó generaciones anfimicas (hembras y machos) y hermafroditas, así mismo se presentaron de color rojo vino las larvas infectadas lo cual es consistente con estudios realizados por Ándalo *et al.*, (2010), Stock *et al.*, (1999), Rosa *et al.*, (2000). que describe la sintomatología presentada en larvas de *G. mellonella* infectada por el género *Heterorhabditis* sp presentando un color rojo oscuro debido a la pigmentación de *Photorhhdus* sp., así mismo esta especie fue descrita por primera vez por Poinar *et al.*, (1976) con *H. bacteriophora*.

En el género *Steinernema* sp se observó generaciones anfimicas (hembras y machos) de color cremoso consistente con varios estudios que se han realizado en otros lugares (Stock *et al.*, (1996), (2001), Navarro, (2006), Nguyen *et al.*, (2007), Boemare, (2002), Kaya y Gaugler, (1993).

4.3.2 Aislamiento e identificación de las bacterias simbiote

4.3.3 Caracterización morfológica a nivel de género de las bacterias simbiotes

Se obtuvieron cuatro aislados de *Photorhabdus* sp los cuales se caracterizaron como Gram negativas, observándose variación fenotípica (fase I y fase II) durante la incubación in vitro metabolizando los sustratos respectivos absorbiendo azul de bromotimol (NBTA), presentando colonias moradas y absorbiendo el rojo neutro en agar MacConkey. Las colonias en la fase I se caracterizaron por presentar forma convexa, brillantes y de consistencia mucosa. Las colonias en la fase II se caracterizaron por presentar colonias mucosidad y poca capacidad de absorción de los sustratos en la reducción de los pigmentos y producción de antibióticos e inclusión de cuerpos cristalinos (Figura 5). Cada una fue identificada a través de características culturales, morfológicas y pruebas fisiológicas según la clave taxonómica de Nguyen *et al.*, (2007) (Cuadro 6).

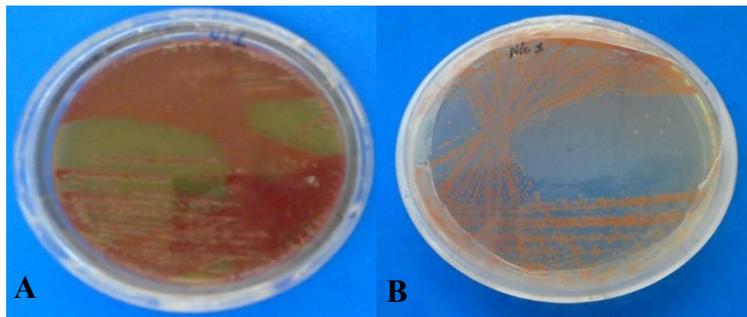


Figura 5. Colonias características de *Photorhabdus* sp en medio agar nutriente (A. fase I y B. fase II)

Cuadro 6. Resultado de las características culturales, fisiológicas de *Photorhabdus sp* (Akhurst y Boemare, 1993).

Características Culturales, Morfológicas y Fisiológicas <i>Photorarbdus</i>			
Características Culturales	Superficie	Lisa	
	Elevación	Convexa	
	Color	Amarilla	
	Borde	Irregular	
	Forma	Bacilar	
Características Morfológicas	Presencia del hilo KOH 3%	+	
	Agar yema	Huevo	Peritrico
	Presencia flagelo		
Características Fisiológicas	Oxidasa	-	
	Catalasa	+	
	Desarrollo colonias NBTA- TTC AGAR	Naranja (
	Desarrollo colonias MacConkey Agar	Roja	

4.3.4 Pruebas bioquímicas

4.3.4.1 Determinación de *Photorhabdus* a nivel de subespecies

Se caracterizó por presentar una temperatura de crecimiento que oscila entre 38⁰C y 39⁰C en agar nutriente, hidroliza la esculina, débilmente para la producción de índole, negativa para la prueba de urea, hemolítica en agar sangre de cordero. Por lo tanto, los aislados (Nic 1, Nic2, Nic9) pertenecen a la subespecie *Luminescens*. Esta subespecie se asocia con el subgrupo de *H. bacteriophora*. Estas características coinciden con las descritas en la clave taxonómica de Nguyen *et al.*, (2007) (Cuadro 7).

El aislado St se caracterizó por presentar una temperatura de crecimiento que oscila entre 38⁰C y 40⁰C en agar nutriente, hidroliza la esculina, índole es variable y ureasa positiva, hemolítica en agar sangre de cordero por lo tanto pertenece a la subespecie *Akhurstii*. Esta subespecie está asociada simbióticamente con *H. Indica*. Estas características coinciden con las descritas en la clave taxonómica de Nguyen *et al.*, (2007) (Figura 6) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización de las especies, la que estuvo basada en la capacidad para oxidación de dos hexosas alcohólicas (Inositol, manitol).

Características	St	Nic1	Nic2	Nic9
Temperaturas de crecimiento	35-40	38-40	38-40	38-40
Pigmentación	+	+	+	+
Dnease	+	+	+	+
Simmons citrate	+	+	+	+
Urease	-	+	+	+
Producción Índole	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+

Aislados/especies: St, *P. luminescens subsp. Akhurstii* (resultado 1 aislado), Nic1, Nic2, Nic3, *P. luminescens subsp. Luminescens* (resultado de 3 aislados) los resultados se tomaron a las 24 horas a 35 °C, + positivo, - negativo

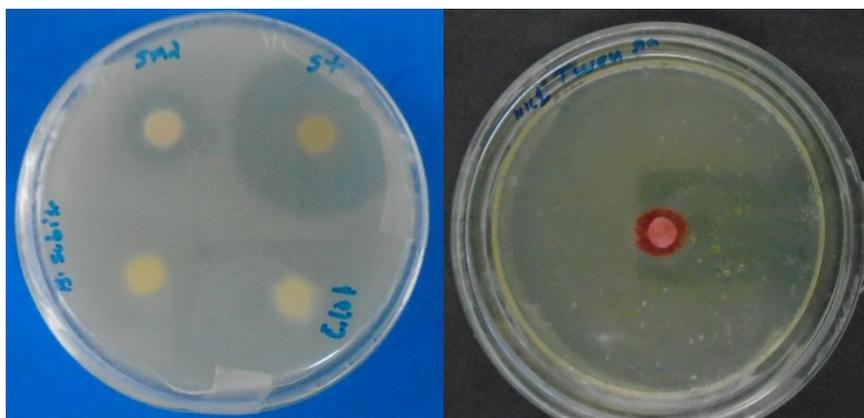


Figura 6. Prueba de Lipasa y Proteasa positiva en medio Luria Broth (LB)

Fischer-Le Saux *et al.*, (1999), Boemare *et al.*, (1993). refieren que el género *Photorhabdus* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* con tres especies claramente identificadas *Photorhabdus luminescens*, *P. temperata* y *P. asymbiotica*, al igual que *P. luminescens* se divide en subespecies *P. luminescens subsp. luminescens*, *P. luminescens subsp. Akhurstii* and *P. luminescens subsp. Laumondii*. Siendo similar en nuestro estudio mostrando la misma tendencia con los resultados expuestos anteriormente, ya que los cuatro aislados pertenecen al género

Photorhabdus sp se caracterizaron como gram negativas, oxidasa negativa, catalasa + característica de este género (Cuadro 8). Así mismo Boemare *et al.*, (1997), Forst *et al.*, (1997), Lang *et al.*, (2011), Zhu *et al.*, (2011) indican que los nematodos entomopatógenos tienen una estrecha relación mutualista con las bacterias simbióticas del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*. Por lo tanto, es importante mencionar que las simbiontes fueron aisladas de infectivos juveniles debido a la estrecha relación de especificidad que hay entre la simbiote y el nematodo.

4.4 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias simbiote *Photorhabdus*. (*P. luminescens* subsp. *Akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *luminescens*)

No hubo diferencias significativas en la interacción cepa-tiempo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los aislados evaluados ($P= 0.6538$) siendo similar para todo los aislados. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas de esta variable en el tiempo ($P= 0.0002$) (Cuadro 8) (Figura 7).

Photorhabdus luminescens subsp. *Akhurstii* fue el aislado que mayor mortalidad presento con 97 por ciento, mientras que el aislado *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* presentó el menor promedio de mortalidad con 94 por ciento. El aislado 2 y 3 (*P. luminescens* subsp. *luminescens*) su porcentaje de mortalidad fue bajo con 95 por ciento en comparación con el aislado *P. luminescens* subsp. *Akhurstii* (Cuadro 8) (Figura 7).

Cuadro 8. Evaluación de la patogenicidad de los aislados *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *luminescens* a una concentración 1×10^8 UFC.

<i>Photorhabdus luminescens</i>	(%) Mortalidad	Tiempo horas	(%) Mortalidad
<i>Subsp. luminescens</i>	94	A 16	92 A
<i>Subsp. luminescens</i>	95	A 24	100 B
<i>Subsp. luminescens</i>	95	A	
<i>Subsp. akhurstii</i>	97	A	

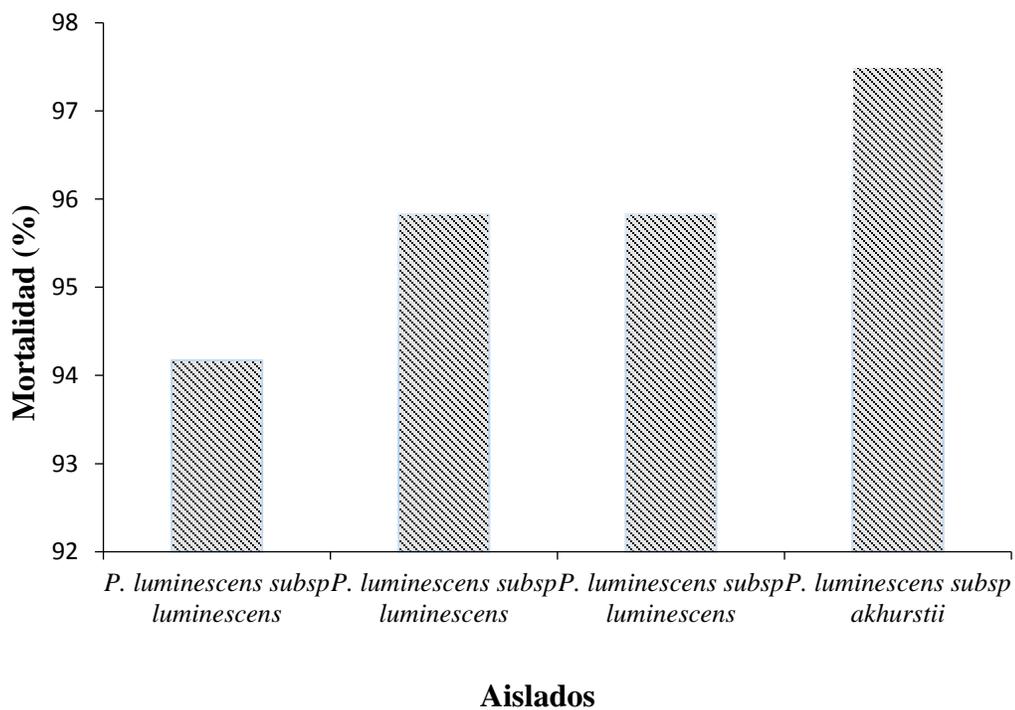


Figura 7. Evaluación de la patogenicidad de los aislados, *P. luminescens* subsp. *Akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *luminescens* a una concentración 1×10^8 UFC.

Estudios realizados por Tiarin *et al.*, (2013) indican que *Photorhabdus luminescens* subsp. *Noenieputensis* después de las 16 horas de inoculadas larvas de *G. mellonella* presentaron el 100 por ciento de mortalidad confirmando el rasgo patogénico. Los resultados de nuestro estudio coinciden con los resultados anteriores, ya que *P. luminescens* subsp. *Akhurstii* causó la mortalidad de 97 por ciento confirmando así el rasgo patogénico. Así mismos estudios han demostrado que la suspensión bacteriana es tóxica a especies de insectos como la hormiga de fuego, *Solenopsis invicta* (*Formicidae*), asperjadas sobre hojas de algodón (*Gossypium hirsutum*) Dudney, (1997) y sobre larvas y pupas de *Spodoptera exigua* Elawad *et al.*, (1999). Los resultados contrastan con los obtenidos por Mahar *et al.*, (2005) quienes obtuvieron una mortalidad del 93% de *G. mellonella* con inoculaciones de *X. nematophila* a una concentración de 4×10^7 cel./ml. Lo cual es importante mencionar *P. luminescens* subsp. *Akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *Luminescens* a una concentración 1×10^8 UFC causó una mortalidad de 95 por ciento.

4.5 Identificación del género *Heterorhabditis* sp basado en amplificación del gen 28S del ARN ribosómico

A partir de infectivos juveniles, utilizando los cebadores gen ARNr 28S se amplifico una banda especifica de 900 pb. Tres aislados son del departamento de Rivas y uno del departamento de Jinotega identificados con el genero *Heterorhabditis*, así mismo es importante mencionar que se corroboró la identificación con su simbiote (Figura 8).

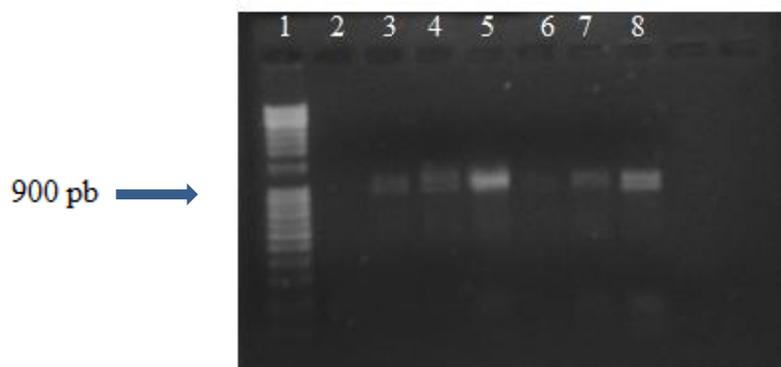


Figura 8. Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de amplificación del gen ribosomal 28S de nemátodos entomopatógenos. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Carril 2: Control negativo, Carril 3: Nic1, Carril 4, 6: Sm2, Carril 5: Nic9, Carril 7: St, Carril 8: control CR-9.

4.6 Identificación molecular

La amplificación PCR del gen ARNr 28S se sometió a digestión con la enzima *Alu I*, identificándose patrones de banda de 340 pb, 240 pb, 150 pb en tres de los aislados correspondiente a *Heterorhabditis bacteriophora* y patrones de 298 pb, 220 pb en uno de los aislado y el control positivo correspondiente a *Heterorhabditis indica*. Por tanto, al comparar los patrones de banda coinciden con los resultados obtenidos por Joyce *et al.*, (1994). Se identifico una especie de *H. indica* (St) y tres especies correspondientes a *H. bacteriophora* (Nic 1, Sm2, Nic 9) (Figura 9).

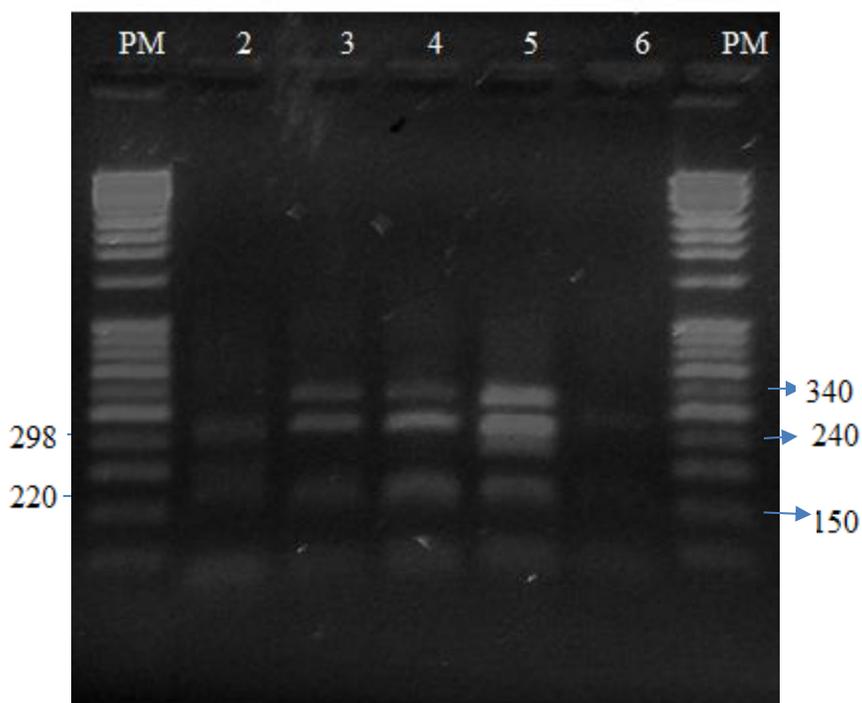


Figura 9. Separación electroforética en gels de agarosa de los productos de la digestión enzimática *Alu I* del gen 28S de *Heterorhabditis*, la letra PM indica Marcador de peso molecular, Carril 2: *H. indica* (St), Carril 3: *H. bacteriophora* (Nic1), Carril 4: *H. bacteriophora* (Sm 2), Carril 5: *H. bacteriophora* (Nic 9), Carril 6: control *H. Indica* (CR9).

Tradicionalmente se ha usado morfometría, morfología y cruces para la identificación de los nematodos entomopatógenos (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) métodos que necesitan una vasta experiencia y que además de ser complicados, toman mucho tiempo Poinar, (1990), Kaya y Stock, (1997), Nguyen y Smart, (1997). En este estudio con este método se logró dilucidar los géneros de nematodos entomopatógenos y su especificidad con su simbiote, sin embargo, no solamente *Heterorhabditis bacteriophora* fue encontrado en las muestras de suelo si no también *Heterorhabditis indica*. Estudios sugieren que los NEP's tienen una amplia distribución y su presencia está determinada por las condiciones específicas del lugar en donde fueron registradas Hazir *et al.*, (2004).

4.7 Evaluación del efecto de cuatro concentraciones de aislados nativos de *Heterorhabditis* sp sobre larvas del segundo estadio larval (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith)

El efecto de los cuatro aislados de *Heterorhabditis* sp sobre la mortalidad de las larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith) in vitro, resultaron en el rango de 40 a 170 infectivos juveniles siendo la mayor mortalidad con la concentración de 170 infectivos juveniles por larva y la menor mortalidad se reflejó en la concentración de 20 infectivos juveniles por larva (Figura 10) (Cuadro 9).

Se encontró diferencias significativas del porcentaje de mortalidad en las concentraciones de 40, 80 y 170 infectivos juveniles y la concentración de 40 infectivos juveniles presentó la mayor mortalidad con el asilado *Heterorhabditis bacteriophora* y la menor concentración con el aislado *Heterorhabditis indica* con 67 por ciento de mortalidad. No hubo diferencias significativas en la mortalidad con el aislado St con la concentración de 20 y 170 infectivos juveniles (Figura 10) (Cuadro 9).

A las 48 horas se encontró el 50 por ciento de mortalidad con los aislados *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica*. Para el caso del aislado *Heterorhabditis bacteriophora* a las 48 horas se obtuvo el 65% de mortalidad con la concentración de 40 infectivos juveniles, en el caso *Heterorhabditis indica* el 50 % de mortalidad se encontró con la concentración de 80 y 170 infectivos juveniles. Para la concentración de 170 infectivos juveniles la mayor mortalidad se observó con aislado *Heterorhabditis indica* y la menor mortalidad con el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* (Figura 10) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de cuatro concentraciones de *Heterorhabditis* sp sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

Aislados	Concentraciones evaluadas (Número de infectivos juveniles -J3- por larva)							
	20		40		80		170	
	Mortalidad (%)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mortalidad (%)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mortalidad (%)	Tukey ($\alpha=0.05$)	Mortalidad (%)	Tukey ($\alpha=0.05$)
St	12	a	67	b	83	a	88	a
Nic-1	9	a	88	a	74	a	76	a
Sm-2	8	a	80	ab	55	b	88	a
Nic-9	8	a	84	ab	67	ab	72	a

*Letras distintas significan diferencias significativas dentro de cada columna, según Tukey ($\alpha = 0.05$)

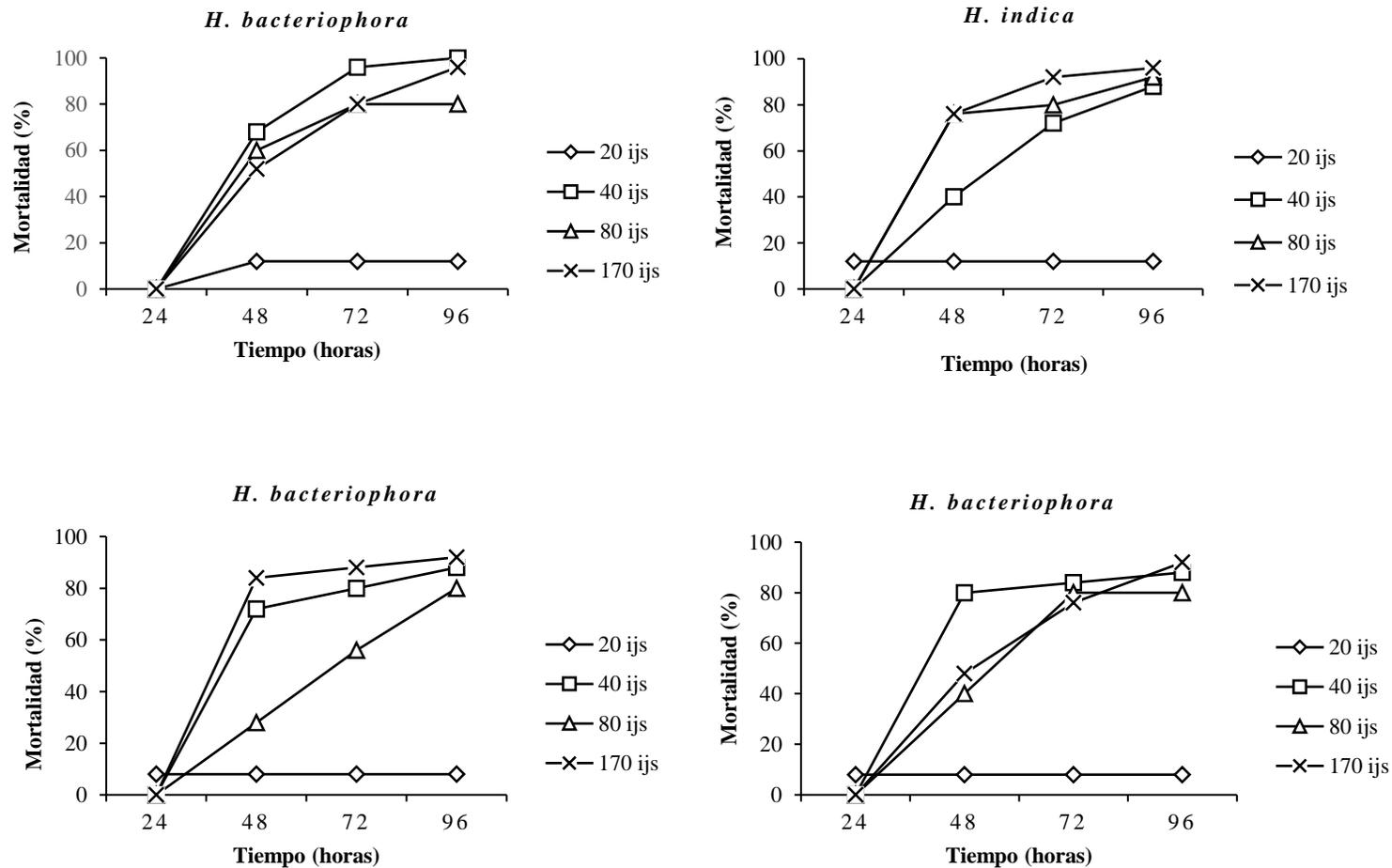


Figura 10. Efecto de cuatro concentraciones de *Heterorhabditis* sp sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Asilado Nic-1, aislado St, aislado Sm-2, aislado Nic-9

El aislado Nic-1 fue efectivo a las 48 horas con una mortalidad del 65 por ciento y aislado St fue efectivo a las 48 horas con una mortalidad del 80 por ciento a una concentración de 80 y 170 infectivos juveniles. Los resultados indican que los aislados Nic-1 y St son potencialmente patógenos de insectos. Resultados similares fueron encontrados por Ándalo *et al.*, (2010) quienes reportaron el género *Heterorhabditis sp* causó la mayor mortalidad a una concentración de 100 y 150 infectivos juveniles. Los resultados del estudio demuestran que a medida que se aumentó la concentración de infectivos juveniles la mortalidad incrementó. Siendo *Heterorhabditis sp* el que causó una mortalidad entre 85% y 90% a la concentración de 250 infectivos juveniles en ensayos de invernadero Ándalo *et al.*, (2010). Así mismo Fuxa, (1988). indica que al evaluar el efecto de diferentes poblaciones de *Steinernema feltiae* sobre *Spodoptera frugiperda* encontró similitud en los porcentajes de mortalidad. Por tanto, también en estos estudios se demuestra que la mortalidad depende del aislado y no del tiempo.

5. Concentración letal media (CL₅₀)

5.1 Aislados *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica*

En el bioensayo de patogenicidad sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith) in vitro, se encontró una alta susceptibilidad en todas las concentraciones de infectivos juveniles usadas. La CL₅₀ encontrada fue de 39 Ijs/ml, indicando un alto grado de patogenicidad (Cuadro 10) Sin embargo, el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* se encontró la CL₅₀ más baja con 39 Ijs/ml mostrando un alto grado de mortalidad y parasitismo sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

Para el caso del aislado *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* se encontró una CL₅₀ 42 a 47 Ijs/ml característico de este aislado para causar una mortalidad de media a alta estas características y su alto porcentaje de parasitismo indican que este entomopatógeno posee características importantes para su utilización como controlador biológico de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Para el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* registro la mayor CL₅₀ 65 Ijs/ml en comparación con los resultados obtenidos con respecto a los demás aislados empleados

en la prueba de patogenicidad. Sin embargo, todas las concentraciones utilizadas mostraron efecto patogénico (Cuadro 10).

Cuadro 10. CL₅₀ valores obtenidos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Aislado Nic-1, aislado St, aislado Sm-2, aislado Nic-9.

Aislados	CL ₅₀	95 % LC	Limites Fiduciales
<i>H. bacteriophora</i>	47	22.90	113.31
<i>H. Indica</i>	42	24.23	69.49
<i>H. bacteriophora</i>	39	20.52	72.13
<i>H. bacteriophora</i>	65	40.33	121.73

La Concentración letal media (CL₅₀) o dosis requerida para matar el 50% de las larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith) el aislado *H. bacteriophora* mostró un valor de 32 Ijs/ ml. El resultado de este ensayo fue menor que el reportado por Morris y Grewal, (2011). inoculando larvas de *Popillia japónica* con *H. bacteriophora*. Al respecto Williams *et al.*, (2013). Reporta que se obtiene entre el 88 y 100 % de mortalidad en condiciones de laboratorio contra picudo a concentraciones de 100, 500 y 1000 Ijs/ml. Lo cual el estudio a una concentración de 258 Ijs/ml se obtiene el 100% de mortalidad. El aislado *H. bacteriophora* resultó más eficiente que el aislado *H. bacteriophora* (sm-2) ya que el aislado *H. bacteriophora* mostró una CL₅₀ baja con 32 Ijs/ml siendo más virulento en comparacion con los otros aislados evaluados. En relación con las larvas se observó una mayor mortalidad al aumentar la concentración de infectivos juveniles, Pero a un tiempo de exposicion considerablemente corto. Mbata y Shapiro-Ilan, (2005). Estudios previos han indicado que la susceptibilidad a los nemátodos entomopatógenos puede verse afectada por la edad o estadio de los insectos. Shapiro-Ilan *et al.*, (2006). indica para una gran cantidad de especies de insectos, se ha descubierto que las larvas son más susceptibles que los adultos. La alta variabilidad de los aislamientos evaluados demostrada con respecto a la virulencia y otras características promisorias proporcionan una cantidad de material biológico para futuras investigaciones en contra de *Spodoptera frugiperda* (Smith) y especialmente con la mejora genética de *Heterorhabditis* sp.

5.2 Tiempo letal medio (TL₅₀)

5.3 Aislado *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*

El tiempo letal medio (TL₅₀) o tiempo requerido para matar el 50% de la población de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Este resultado varió con respecto al aislado evaluado. El menor TL₅₀ (1.41 días) se obtuvo con el aislado *Heterorhabditis indica* en la concentración de 40 Ijs/ml y el mayor TL₅₀ (1.70 días) correspondió al aislado *Heterorhabditis bacteriophora* a una concentración de 40 Ijs/ml (Cuadro 11).

Para la concentración de 20 y 170 Ijs/ml no se logró eliminar el 50% de la población de *Spodoptera frugiperda* (Smith) sin embargo para la concentración de 40 Ijs/ml con el aislado *Heterorhabditis indica* el tiempo letal medio fue de 1.41 días, a una concentración de 80 Ijs/ml, con el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* el tiempo letal medio fue 1.66 días para el aislado Sm-2 el tiempo letal medio correspondió a 1.70 días a una concentración de 40 Ijs/ml y el tiempo letal medio para el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* fue de 1.54 días a una concentración de 80 Ijs/ml (Cuadro 11).

Cuadro 11. TL₅₀ valores obtenidos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* sobre larvas (L2) de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Aislado Nic-1, aislado St, aislado Sm-2, aislado Nic-9.

Aislados	TL ₅₀ (días)	Concentración Ijs/ml
<i>H. bacteriophora</i>	1.66 (1.25 -2)	80
<i>H. indica</i>	1.41 (1-2)	40
<i>H. bacteriophora</i>	1.70 (1.29- 2)	40
<i>H. bacteriophora</i>	1.54 (1.25- 1.87)	80

Todos los aislados indican que son patogénicos para controlar a *Spodoptera frugiperda* (Smith), Resultados similares encontro Monique *et al.*, (2018). El porcentaje mortalidad de larvas aumenta a medida que aumenta la concentración de infectivos juveniles. Los resultados de este estudio demuestran que a medida que se aumentó la concentración de infectivos juveniles la mortalidad incremento. Sin embargo, De Waal *et al.*, (2011) al evaluar el efecto de diferentes

aislados de *Heterorhabditis zealandica* SF41, sobre la pupa de la polilla de la manzana se obtuvo una CL_{50} de 275 Ijs/ml y una TL_{50} de 2 días, siendo *Heterorhabditis sp* aislado *H. indica* a una concentración de 40 Ijs logro matar el 50 % de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en 1.70 días. Una condición importante se observó en los aislados es la relación nematodo- hospedero cuando entraban en contacto. Cuando se aplicó las dosis evaluadas muchas veces al hacer observaciones al estereoscopio. Se constató que los infectivos juveniles no caen directamente sobre el cuerpo de la larva de *Spodoptera frugiperda*, si no que los infectivos juveniles iban en búsqueda de su huésped cuando este entraba en movimiento.

V. CONCLUSIONES

Se caracterizaron e identificaron 11 aislados nativos de nematodos entomopatógenos en las zonas muestreadas que corresponden a los géneros identificados *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica*.

Las bacterias simbiontes caracterizadas e identificadas fueron *Photorhabdus luminescens subsp. Akhurstii* y *Photorhabdus luminescens subsp. Luminescens* asociadas a los nematodos *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*.

Heterorhabditis bacteriophora presentó el mayor rendimiento de infectivos juveniles con 790 Ijs.

Heterorhabditis bacteriophora presentó la menor CL_{50} con 39 infectivos juveniles y la menor Tl_{50} encontrada en este estudio fue de 1.41 días

VI. RECOMENDACIONES

Aislar y coleccionar muestras de otras localidades para la búsqueda de más aislados nativos y evaluar sus efectos en plagas insectiles.

VII. LITERATURA CITADA

- Akhurst, R. J., and Boemare, N. E. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (*Enterobacteriaceae*) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology* 134, 1835-1845.
- Amador, M., Molina, D., Guillen, C., Parajales, E., Jiménez, K., and Uribe, L. 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano cosmopolites sordidus en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense*, 39(3), 47-60.
- Ándalo, V., Santos, G., Furtado Moreira, C., Costa Moreira, and J. A. Moino, 2010. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. *Ciencia Rural* 40:1860-1866.
- Baird, C. 2001. *Química Ambiental*. España: Editorial Reveté S.A.
- Badii, M. H., and Abreu, J. L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.
- Badii, M. H. 2004. Sustentabilidad: fundamentos, perspectivas y limitaciones. *Innovaciones de Negocios*, 1(2): 199-227
- Badii, M.H. & I. Ruvalcaba. 2006. Fragmentación del hábitat: el primer jinete de Apocalipsis. *Calidad Ambiental*, XI (2): 8-13.
- Bedding, R. A., and Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditis nematodes in soil. *Nematologica*. 21:109-110.

- Bedding, R. A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp. (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27: 109-114.
- Beddington, J. R., C. A. Free and J. H. Lawton. 1978. Characteristics of successful natural enemies in models of biological control of insect pests. *Nature* 273: 513-519.
- Bento, J. M. S. 1999. Perdas por insetos na agricultura. *Ação Ambient.* 4, 19e21.
- Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* (30), 93-100.
- Bedding, R. A., Molyneux, A. S., and Akhurst, R. J. 1983. *Heterorhabditis* spp., *Neoplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Experimental Parasitology*, 55(2), 249-257.
- Bedding, R. A. 1984. Large scale production storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoplectana* spp and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*, 104(1), 117-120.
- Bedding, R. A., Tyler, S. and Rochester N. 1996. Legislation on the introduction of exotic entomopathogenic nematodes into Australia and New Zealand. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 465-476.
- Boemare, N. E., Akhurst, R. J., and Mourant, R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *international Journal of Systematic Bacteriology* 43, 249–255.
- Boemare, N., Thaler, J. O., Lanois, A. 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis* 22,167–175.

- Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* . In: Gaugler R, editor. Entomopathogenic Nematology. Wallingford, UK: CAB International; pp. 35–56.
- De Waal, J. Y., Malan, A. P., and Addison, M. F. 2011. Evaluating mulches together with *Heterorhabditis zealandica* (*Rhabditida: Heterorhabditidae*) for the control of diapausing codling moth larvae, *Cydia pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Tortricidae*). *Biocontrol Science and Technology*, 21(3), 255-270.
- Dudney, R. 1997. Use of *Xenorhabdus nematophilus* m/1 and 1906/1 for Fire Ant Control. US Patent Application 5616 318.
- Fischer-Le Saux, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P., and Boemare, N. E. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov. *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1645-1656.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Reviews in Microbiology*, 51(1), 47-72.
- Fuxa, J. R. 1988. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology*, v.20, n.1, p.91-95.
- Goellner, C. I. 1993. Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil: análise do seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana. Artgraph, São Paulo, Brazil.

- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., and Keskin, N. 2004. Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 181-202.
- Joyce S. A., Burnell A. M., and Powers T.O. 1994. Characterisation of *Heterorhabditis* isolates by PCR amplification of segments of mtDNA and rDNA gene. *Journal of Nematology*, 26: 260-270.
- Kaya H. K., and Stock S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In *Manual of techniques in insect pathology* (Edited by Lacey L.A). Biological technique series academic press, San Diego California. P 281-324.
- Kaya H. K. and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.
- King, A. B. S. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga spp.*) of economic importance in Central America. *Tropical pest management* 30:36-50.
- Koppenhöfer, H. S. 2007. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. In Nguyen, K.B., and Hunt, D.J. (Eds), *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*, Brill Publishing, Leiden, the Netherlands, pp. 735-808.
- Lacey, L., Frutos, R., Kaya, H., Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*. 21: 230–248.
- Lang, A. E., Schmidt, G., Sheets, J. J., Aktories, K. 2011. Targeting of the actincytoskeleton by insecticidal toxins from *Photorhabdus luminescens*. *N-S Arch. Pharmacol.* 383, 227–235.

- Liu J., Poinar G.O., Berry R.E. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annual Review of Entomology* 45(1):287-306.
- MAG-FOR. 2008. Ministerio Agropecuario y Forestal, Estadísticas mensuales del MAGFOR, disponible en http://www.magfor.gob.ni/estadisticas_mensuales_2008.htm. Accesado el 02-09-2010.
- Mbata, G. N., and Shapiro-Ilan, D. I. 2005. Laboratory evaluation of virulence of *Heterorhabditis* nematodes to *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 34(3), 676-682.
- Melo-Molina, E. L., Ortega-Ojeda, C. A., y Gaigl, A. 2007. Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anómala insconstans* (Coleóptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 33(1):21-26.
- Monique., James Antoinette., Paula Malan., Pia Addison. 2018. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Crop Protección* 105 (2018) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.008>.
- Morales, R. 2012. Estimación de la concentración y tiempo letal del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) para el control de *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera: *Curculionidae*) (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012).
- Morris, E. E., and Grewal, P. S. 2011. Susceptibility of the Adult Japanese Beetle, *Popillia japonica* to Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology*, 43(3-4), 196–200.

- Navarro, D. 2006. Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias simbiotas de nematodos entomopatógenos (*Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*), aislados de suelos costarricenses. Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, San José, Costa Rica. 175p.
- Nguyen, K. B., Smart, G. C. Jr 1997. Scanning electron microscope studies of spiculas and gubernacula of *Steinernema* spp. (Nematoda: *Steinernematidae*). *Nematologica* 24: 465-480.
- Nguyen, K. B., Hunt, D. J., Mracek, Z. 2007. Entomopathogenic nematode: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. *Nematology Monographs and Perspectives*. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands. Capítulo 4. *Steinernematidae*. Species descriptions.
- Nguyen, K. B., Stuart, R. J., Andalo, V., Gozel, U., and Rogers, M. E. 2007. *Steinernema texanum* n. sp. (*Rhabditida: Steinernematidae*), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. *Nematology*, 9(3), 379-396.
- Ortiz, E., Calvache., Louque, E. 1994. Control Microbiano de *Sagalassa valida*, Walker con el nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser) en Tumaco, Nariño. *Palmas* 5 (1): 29-38.
- Poinar G. O. Jr. 1975. Entomogenous nematodes. A manual and Bost list of insect's nematodes associations. E.J. Brill. Leiden, 317 P.
- Poinar, G. O., Jr, Lane, R. S., and Thomas, G. M. 1976. Biology and redescription of *Pheromermis pachysoma* (V. Linstow) n. gen. comb. (*Nematoda: Mermithidae*), a parasite of yellowjackets (*Hymenoptera: Vespidae*). *Nematologica* 22, 360-370.
- Poinar, G. O. Jr. 1990. Taxonomy and biology of *Steinernenmatidae* and *Heterorhabditidae*, pp. 23-61. En: Gaugler, R.; Kaya, H. K. (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 356 p.

- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A., Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., and Harris, T. S. (1997). The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441.
- Realpe-Aranda F. J., Bustillo-Pardey A. E., López-Núñez, J. C. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé* 58: 142-157.
- Rodríguez, D., Torres, M., Uribe, L., y Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios 12 y 13 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. En condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 33(2): 171-182. ISSN: 0377-9424.
- Rosa J. S., Bonfassi E., Amaral J., Lacey L. A., Simoes N., Laumond, C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (*Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis*) in the Azores. *Journal of Nematology*. 32:215-222.
- Saénz, A. A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas* 26 (2): 41-57.
- Shapiro Ian., D. I., Gaugler, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology* 28: 137-146.
- Shapiro-Ilan D. I., Gough D. H., Piggott S. J., Patterson Fife J. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control* 38: 124-133.
- Stock S. P., Chool, H. Y., and Kaya, H. K. 1996. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n. (*Rhabditida: Steinernematidae*) from Korea with a key to other species. *Nematological*. 43:15-29.

- Stock, S. P., Pryor, B. M., and Kaya, H. K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation*, 8(4), 535-549.
- Stock, S. P., Campbell, J. F., and Nadler, S. A. 2001. Phylogeny of *Steinernema Travassos*, 1927 (*Cephalobina: Steinernematidae*) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87:877–889.
- Stock S. P. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de los nematodos parasitos de insectos. In: S. P. Stock, L. Uribe, L. Uribe-Lorio (Eds). *Curso teórico Práctico. Aplicaciones Biotecnológicas de los nematodos parasitos de insectos. CIA-CIBCM-CIPROC-CONICIT-CRUSA-UNU-BIOLAC.* 87 p.
- Ferreira, T., Van Reenen, C., Pages, S., Tailliez, P., Malan, A. P., and Dicks, L. M. 2013. *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(5), 1853-1858.
- Williams, T., Arredondo-Bernal, H. C., and L. A. Rodriguez-del-Bosque .2013. Biological pest control in Mexico. *Annual Review of Entomology*, 58: 119–40.
- Whitney, S. C., and R. J. Zimmerman. 1989. Biological, Mechanical, and Chemical Control of turfgrass- infesting Scarabs in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 14(4):351-355.
- Zhu, H., Grewal, P. S., Reding, M. E. 2011. Development of a dessicated cadáver delivery system to apply entomopathogenic nematodes for control of soil pests. *Appl. Applied Engineering in Agriculture*, 27(3), 317-324.

Zimmermann, G. 1986. The galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil.
Journal of Applied Entomology, 102:213-215.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN bacterianos

1. Depositar 500 µl de la suspensión de nematodos en un tubo para microcentrifuga 1.5 ml
2. Centrifugar durante 3 minutos a 13200 r.p.m hasta obtener un botón de nematodos, eliminar cuidadosamente el sobrenadante
3. Realizar 3 lavados del botón de nematodos con agua destilada estéril y centrifugar a 13200 r.p.m posteriormente eliminar el sobrenadante
4. Adicionar al botón de nematodos 200 µl de buffer de lisis, 15 µl de SDS 20% y 20 µl de proteinasa K 20 mg/ml
5. Colocar una punta de espátula de perlas de vidrio en cada tubo y macerar con pistilos aproximadamente 15 minutos
6. Adicionar 300 µl del buffer de lisis e incubar a 80°C durante 10 minutos agitándose por inversión constantemente
7. Luego de la incubación colocar el tubo inmediatamente en hielo
8. Adicionar 20 µl de proteinasa k e incubar durante una hora a 55 °C
9. Luego de la incubacion se Adicionar 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo-isoamilo 24:1 agitar por inversión y centrifugar a 13 200 r.p.m durante 5 minutos
10. Recuperar cuidadosamente la fase acuosa (capa superior) y será transferida a un tubo de microcentrifuga
11. Adicionar 250 µl de cloroformo, agitar por inversión posteriormente centrifugar durante 5 minutos a 13200 r.p.m
12. Transfiera la fase acuosa a un tubo Nuevo y se adicionara 1/10 de acetato de sodio3M y 2.5 del volumen total de etanol al 95 %
13. Mezclar por inversión y almacenar a -20 °C durante 20 horas
14. Centrifugar 10 minutos a 13200 r.p.m y eliminar el sobrenadante
15. Adicionar 250 µl de etanol al 70 % y centrifugar por 10 minutos a 13200 r.p.m y eliminar el sobrenadante
16. Los botones de ADN se secarán colocandolos los tubos por inversión sobre papel toalla hasta que se evapore el etanol

17. El ADN será resuspendido en 50 μ l de TE se almacenará a -20°C