

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el  
Desarrollo Integral Regional  
Unidad Oaxaca**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE  
RECURSOS NATURALES  
(PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL)**

**EVALUACIÓN DE DOS FORMULACIONES DE NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA  
(*Phyllophaga vetula*) EN MAÍZ**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA**

**SERGIO GIRÓN PABLO**



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 19 del mes de mayo del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz**

Presentada por el alumno:

Girón	Pablo	Sergio
Apellido paterno	materno	nombre(s)
		A 0 6 0 1 6 5


Con registro:


aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA  
Director de tesis

  
Dr. Jaime Ruiz Vega

  
Dr. José Antonio Sánchez García

  
M. en C. Laura Martínez Martínez

  
Dr. Celerino Robles Pérez

  
Dr. Rafael Pérez Pacheco

LA PRESIDENTA DEL COLEGIO

  
Dra. María del Rosario Arnaud Viana





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 19 del mes mayo del año 2008, el (la) que suscribe **Girón Pablo Sergio** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A060165**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del : Dr. Jaime Ruiz Vega y cede los derechos del trabajo titulado: **Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz.**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoox@ipn.mx](mailto:posgradoox@ipn.mx) ó [serciidi@hotmail.com](mailto:serciidi@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**GIRÓN PABLO SERGIO**



INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
CIDIR-UNIDAD-OAXACA

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la posibilidad de usar formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control efectivo de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga vetula* Horn) en maíz (*Zea mays* L.). Se establecieron tres experimentos. En el experimento uno se comparó la mortalidad de larvas de *Ph. vetula* causada por la aplicación de cada una de las siguientes especies de nematodos: *Steinernema glaseri* Steiner, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar y *Steinernema feltiae* Filipjev, aplicados en suspensión acuosa en cinco dosis (50, 100, 200, 500 y 1000 nematodos por cada larva). Además, se determinaron dosis letales y tiempos letales para cada una de estas especies. La diferencia entre tratamientos fue altamente significativa, *S. glaseri* aplicado en una dosis de 1000 nemátodos por larva causó la mayor mortalidad de éstas (97.5%). De acuerdo con el análisis Probit (SAS, 1988), la dosis y tiempo letal para causar una mortalidad de 95% fue de 1035 nematodos y 16 días respectivamente. En el experimento dos se comparó la mortalidad de larvas de *Ph. vetula* utilizando las mismas especies de nematodos que en el experimento uno, pero ahora en tres formas de aplicación (formulados en cadáver de larva de *Galleria mellonella* L., formulados en *pellet* de bentonita y aplicados en suspensión acuosa) y dos condiciones de humedad del suelo (moderada: -0.60 MPa y alta: -0.08 MPa). La diferencia entre tratamientos fue altamente significativa, el nematodo más efectivo fue *S. glaseri* aplicado en suspensión acuosa y bajo condiciones de humedad moderada, causando una mortalidad de larvas del 75%. El tratamiento que le siguió en efectividad fue la formulación en cadáver con esta misma especie de nematodo y bajo las mismas condiciones de humedad, causando una mortalidad de 55%. En el experimento tres se comparó la mortalidad de larvas de *Ph. vetula* causada por la aplicación de *S. glaseri* en cada una de las siguientes formulaciones: cadáver de larva de *G. mellonella* y *pellet* de bentonita, en tres tiempos de aplicación (en plantas de maíz con siete, ocho y nueve hojas) y en tres densidades de larvas de *Ph. vetula* por planta (cuatro, ocho y 12); además, se determinó el umbral económico de daño para la larva de gallina ciega en su segundo estadio. En este experimento se utilizó únicamente *S. glaseri*, que fue la especie de nematodo que presentó los mejores resultados en los experimentos uno y dos.

La diferencia entre tratamientos fue altamente significativa. La formulación más sobresaliente fue cadáver de larva de *G. mellonella* aplicada en plantas de maíz con siete hojas, con una densidad de cuatro larvas de *Ph. vetula* por planta, este tratamiento igualó la producción de materia seca del tratamiento testigo. El umbral económico de daño fue de 1.5 larvas de gallina ciega de segundo estadio por planta.

**Palabras clave:** Formulación, *Steinernema glaseri*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Phyllophaga vetula*.

### ABSTRACT

The aim of this work was to determinate the possibility to use formulations of entomopathogenic nematodes for the control of white grubs (*Phyllophaga vetula* Horn) in corn (*Zea mays* L.). Three experiments were established. In experiment number one the mortality of *Ph. vetula* larvae caused by the application of each one of several nematode species was determined. *Steinernema glaseri* Steiner, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar and *Steinernema feltiae* Filipjev, were applied in aqueous suspension, at five doses (50, 100, 200, 500 and 1000 nematodes per larva); also lethal doses and lethal times for each one of this species were determined. The difference among treatments was highly significant; *S. glaseri* applied at a dosage of 1000 nematodes per larva caused the highest larvae mortality (97.5%). According to Probit analysis (SAS, 1988) the doses and lethal time to cause a 95% of mortality were of 1035 nematodes and 16 days respectively. In experiment number two the mortality of *Ph. vetula* larvae utilizing the same nematode species used in experiment number one was compared. Three application forms (formulated in cadaver of *Galleria mellonella* L. larvae, formulated in bentonite pellets, and unformulated applied on aqueous suspension) and two soil humidity conditions (moderate: -0.60 MPa and high: -0.08 MPa) were evaluated. Also in this experiment the difference among treatments was highly significant, the most effective nematode was *S. glaseri* applied on aqueous suspension and under moderate humidity conditions, causing 75% of larvae

mortality, the second more effective treatment was the formulation in cadaver with the same nematode specie and under the same conditions of humidity, with 55% mortality. In experiment number three the mortality of *Ph. vetula* larvae caused for the application of *S. glaseri* in different formulations was compared. Cadavers of *G. mellonella* larva and bentonite pellets, at three opportunities of application control (at corn plants with seven, eight and nine leafs) and three *Ph. vetula* larvae densities per corn plant (four, eight and twelve) were evaluated. Also, the economic damage threshold for second instar white grubs was obtained. In this experiment only *S. glaseri* was used since it was the nematode that produced the better results in experiments one and two. The difference among treatments was highly significant. The most outstanding formulation was cadavers of *G. mellonella* larvae applied in the 7 leaf stage, with a density of four *Ph. vetula* larvae per corn plant; this treatment produced the same fresh and dry weight of the control treatment. The economic damage threshold was of 1.5 second instar white grub larvae per plant.

**Key words:** Formulation, *Steinernema glaseri*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Phyllophaga vetula*.

## **Agradecimientos**

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca por brindar me la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

Al Instituto para México y los Estados Unidos de la Universidad de California (UC MEXUS) por el apoyo brindado para la realización de la fase experimental.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega Director de mi Proyecto de Investigación, que con su amplia experiencia en el campo de la investigación y su atinada guía permitió llevar a buen término este trabajo.

Al Dr. Celerino Robles Pérez miembro del Comité revisor, por su asesoría en el análisis de los resultados, su exhaustiva revisión al escrito y sus productivas correcciones y observaciones.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco miembro del Comité Revisor por sus atinadas sugerencias y correcciones, resultado de su amplio conocimiento científico en el campo de los nematodos.

Al Dr. José Antonio Sánchez García miembro del Comité Revisor por su amplia revisión al escrito y sus atinadas correcciones y observaciones.

A la M. C. Laura Martínez Martínez miembro del Comité Revisor por su asesoría en el desarrollo del trabajo, por sus consejos y sugerencias y por la orientación para afinar el escrito a través de sus observaciones y correcciones.

Al Dr. José Luís Chávez Servia por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A la M. C. Maria Eugenia Silva Rivera por su apoyo operativo y logístico en el desarrollo del trabajo de investigación, por su asesoría, por la revisión exhaustiva del escrito y sus atinadas correcciones y observaciones, pero ante todo, por su invaluable amistad y apoyo moral.

Al M. C. Teodulfo Aquino Bolaños por brindarme asesoría y compartir todo el cúmulo de conocimientos y experiencia que posee en el campo de los nematodos entomopatógenos.

A la Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández por sus invaluable consejos y orientación para incursionar en el campo de la investigación.

Al Ing. Julián Hernández Cruz por su valioso apoyo operativo en todo momento.

Al Ing. Miguel Ángel Cruz Sánchez gran amigo y compañero por su apoyo incondicional en los momentos de mayor trabajo.

A todas y cada una de las personas que colaboraron para la obtención de esta tesis, GRACIAS.



## **Dedicatorias**

A DIOS.

A mis padres Margarito Girón y Rafaela Pablo que han dado su vida por apoyarme, brindándome la mayor riqueza que es el amor y el ejemplo en el trabajo.

A mi esposa Araceli Solorza que ha estado a mi lado hombro con hombro, en los momentos buenos y malos de nuestra vida, dándome fortaleza y enseñándome que el amor es la única fuerza que vence toda adversidad y para la cual no hay imposibles; y a nuestras hijas Viany y Niza, que son nuestros tesoros. Para ellas tres, la dedicación especial de este trabajo.

A mis hermanos Cenobio, Miguel Ángel, Abel, Herminia y Elia porque en ellos siempre he encontrado apoyo y comprensión.

A mis cuñadas María Leticia y Teresa y mi cuñado Julián, quienes han fomentado una armonía familiar que reconforta y permite seguir adelante.

A mis sobrinos Víctor, José Manuel, Miguel Ángel, Didier y Josué y a mi sobrina Nelly su hija Dolet y su esposo Demetrio quienes han llenado de alegría nuestros corazones.

A mis suegros Álvaro Solorza y Elvia Gómez que me han apoyado incondicionalmente en todo momento, mostrándome su amor y aprecio. Y a mis cuñados Álvaro y Wilver por todas sus muestras de cariño y apoyo.

A Graciela Zárate Altamirano por todo el apoyo que me ha brindado.

A todos aquellos que de una o de otra manera me han apoyado a lo largo de mi vida.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
2.3. Hipótesis nulas.....	4
<b>CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
3.1. El recurso suelo.....	5
3.2. La plaga de “gallina ciega” ( <i>Phyllophaga</i> spp.).....	5
3.2.1 Taxonomía de <i>Phyllophaga</i> .....	6
3.2.2 Descripción y biología.....	7
3.2.3 Daños causados.....	10
3.3. Alternativas para el control de plagas.....	11
3.3.1 Nematodos entomopatógenos.....	11
3.3.1.1. Taxonomía de los nematodos entomopatógenos.....	12
3.3.1.2. Morfología.....	12
3.3.1.3. Comportamiento.....	12
3.3.1.4. Ciclo biológico.....	13
3.3.1.5. Cría masiva.....	15
3.3.1.6 Rango de hospederos.....	16
3.4. Uso de nematodos entomopatógenos (NE) como agentes de control biológico en México.....	17

## **CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

4.1. Área de estudio.....	21
4.2. Semilla de maíz utilizada en los experimentos.....	21
4.3. Obtención de material biológico de gallina ciega ( <i>Phyllophaga vetula</i> ).....	22
4.4. Mantenimiento de la colonia de <i>Galleria mellonella</i> .....	22
4.5. Origen de los nematodos utilizados en los experimentos.....	25
4.6. Cultivo de los nematodos.....	25
4.7. Formulación de los nematodos.....	27
4.7.1. Formulación en cadáver.....	28
4.7.2. Formulación en <i>pellet</i> .....	28
4.7.3. Aplicación en medio acuoso.....	28
4.8. EXPERIMENTO 1.....	28
4.8.1. Factores en estudio.....	28
4.8.2. Procedimiento experimental.....	29
4.9. EXPERIMENTO 2.....	30
4.9.1. Factores en estudio.....	30
4.9.2. Procedimiento experimental.....	31
4.10. EXPERIMENTO 3.....	34
4.10.1. Factores en estudio.....	34
4.10.2. Procedimiento experimental.....	34
4.10.3. Cálculo del umbral económico (UE).....	36

## **CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

5.1. EXPERIMENTO 1.....	38
5.1.1. Mortalidad de gallina ciega por aplicación de nematodos en diferentes dosis.....	38
5.1.1.1. Análisis de la mortalidad por niveles de los factores.....	40
5.1.2. Determinación de dosis y tiempos letales.....	41
5.1.2.1. Dosis letales.....	41
5.1.2.2. Tiempos letales.....	42
5.2.1. Mortalidad de gallina ciega por aplicación de nematodos en diferentes formulaciones y condiciones de humedad.....	43

5.2.1.1. Análisis de la mortalidad por niveles de los factores.....	45
5.3. EXPERIMENTO 3.....	46
5.3.1. Altura de plantas de maíz.....	46
5.3.2. Número de hojas de plantas de maíz.....	47
5.3.3. Peso fresco de follaje de plantas de maíz.....	48
5.3.4. Peso seco de follaje de plantas de maíz.....	50
5.3.4.1. Análisis del peso seco de follaje por niveles de los Factores.....	51
5.3.5. Pesos fresco y seco de raíz, pesos fresco y seco total de la planta.....	52
5.3.6. Análisis de correlación entre las variables número de larv as y porcentaje de pérdida de materia seca.....	53
5.3.7. Análisis de regresión lineal entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca.....	54
5.3.8. Cálculo del umbral económico (UE).....	56
5.3.8.1. Umbral económico para producción de forraje seco.....	57
5.3.8.2 Umbral económico para producción de maíz grano.....	58
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

1	Tratamientos aplicados en el experimento uno.....	29
2	Tratamientos aplicados en el experimento dos.....	31
3	Tratamientos aplicados en el experimento tres.....	35
4	Porcentajes de mortalidad de gallina ciega ( <i>Phyllophaga vetula</i> ) observados como resultado de la aplicación de tres especies de nematodos en diferentes dosis.....	39
5	Mortalidad de gallina ciega por niveles de los factores.....	40
6	Porcentajes de mortalidad de gallina ciega ( <i>Ph. vetula</i> ) observados como resultado de la aplicación de tres especies de nematodos en diferentes formulaciones y condiciones de humedad.....	44
7	Mortalidad de gallina ciega por niveles de los factores.....	45
8	Cambios en altura de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de <i>Ph. vetula</i> y momentos de aplicación del nematodo <i>Steinernema glaseri</i> en diferentes formulaciones.....	47
9	Cambios en número de hojas de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de <i>Ph. vetula</i> y momentos de aplicación del nematodo <i>S. glaseri</i> en diferentes formulaciones.....	48
10	Cambios en peso fresco de follaje de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de <i>Ph. vetula</i> y momentos de aplicación del nematodo <i>S. glaseri</i> en diferentes formulaciones.....	49
11	Cambios en peso seco de follaje de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de <i>Ph. vetula</i> y momentos de aplicación del nematodo <i>S. glaseri</i> en diferentes formulaciones.....	50
12	Peso seco de follaje de plantas de maíz por niveles de los factores.....	52
13	Costo de producción de nematodos entomo patógenos en laboratorio y aplicación en campo.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Ciclo de vida anual de “gallina ciega” ( <i>Phyllophaga</i> sp.) (Tomado de Entomology, 2000).....	7
2	Huevecillos de <i>Phyllophaga</i> sp.....	8
3	Larva, pupas y adulto de <i>Phyllophaga</i> sp.....	9
4	Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (Tomado de Dirt Works, 2001).....	14
5	Larvas de <i>Galleria mellonella</i> en dieta artificial.....	23
6	Palomillas de <i>G. mellonella</i> ovipositando.....	24
7	Huevecillos de <i>G. mellonella</i> colocados en dieta fresca para su eclosión y posterior desarrollo (la dieta contiene también restos de panales).....	25
8	Larvas de <i>G. mellonella</i> en cajas de Petri para inocularse posteriormente con nematodos.....	26
9	Larvas de <i>G. mellonella</i> en trampas White.....	27
10	Concentraciones letales de los nematodos <i>Steinernema glaseri</i> (Sg), <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (Hb) y <i>Steinernema feltiae</i> (Sf).	41
11	Tiempos letales de los nematodos <i>S. glaseri</i> (Sg), <i>H. bacteriophora</i> (Hb) y <i>S. feltiae</i> (Sf).....	42
12	Valores observados y predichos de la relación entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca.....	55

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos ha originado diversos problemas de contaminación en el ambiente, así como resistencia en los insectos plaga; en la actualidad existe una gran oposición a su uso y una búsqueda de alternativas de control. Una de las respuestas a este problema ha sido el control biológico, que consiste en el uso de enemigos naturales para el control de determinadas plagas.

Dentro de este contexto, a partir de la década de los años 1980 y hasta nuestros días, el uso de los nematodos entomopatógenos adquirió un papel relevante en el control microbiano, similar al de las bacterias, virus y hongos (Aguirre y Salazar, 1999), especialmente en los E. U. A.

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son parásitos obligados de insectos (Kaya y Gaugler, 1993). Los infectivos juveniles entran en el hospedero y liberan una bacteria simbiótica, la cual causa la muerte al hospedero y facilita el aprovechamiento de nutrientes por los nematodos (Poinar, 1990). Estos organismos son importantes agentes de biocontrol para una diversidad de plagas de importancia económica (Grewal y Georgis, 1998), pueden ser aplicados comercialmente en suspensión acuosa por medio de sistemas de irrigación, como aspersión o técnicas de riego por goteo (Georgis, 1990).

Se ha reportado que los nematodos entomopatógenos pueden ser aplicados en cadáveres infectados (Creighton y Fassuliotis, 1985). Estudios de laboratorio más recientes, indican que la aplicación de nematodos en cadáveres infectados puede dar mejores resultados que la aplicación en suspensión acuosa (Shapiro y Glazer, 1996). Sin embargo, de acuerdo con Burges (1998),

algunos organismos que han sido muy efectivos en el laboratorio pueden todavía fallar en condiciones de campo, debido a una formulación deficiente.

Por todo esto, uno de los problemas importantes en el uso de organismos naturales para el control de plagas ha sido la falta de formulaciones adecuadas, es decir, cómo, cuándo, en qué dosis y bajo qué densidad de la plaga aplicarlos; resultando fundamental conocer tanto la biología del insecto plaga como la del agente de biocontrol, mejorar las dosis, la forma y el momento oportuno de aplicación (umbral económico).

En la agricultura mexicana, el uso generalizado de los nematodos para el control de insectos, ha sido limitado principalmente por falta de productos formulados a base de estos organismos entomopatógenos en el mercado nacional (Alatorre, 1999).

En los Valles Centrales de Oaxaca (México) se cultivan aproximadamente unas 110, 000 hectáreas de maíz al año, siendo la “gallina ciega” (*Phyllophaga vetula* Horn) una de las principales plagas del suelo en este cultivo (Ruiz *et al.*, 1998).

Experiencias en países desarrollados como E. U. A., indican que el complejo de plaga de “gallina ciega” puede ser controlado con la aplicación de nematodos entomopatógenos, sin embargo, para la agricultura de Oaxaca, es necesario realizar investigación que permita determinar y establecer tanto la efectividad como las condiciones óptimas de aplicación de estos organismos.

Con el presente estudio, se pretende aportar información para identificar la o las especies de nematodos entomopatógenos más eficientes en el control de la gallina ciega en el cultivo de maíz, la formulación más adecuada y las dosis y el momento oportuno de aplicación (umbral económico).



## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1. Objetivo general

Determinar la posibilidad de usar formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control efectivo de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz (*Zea mays*).

#### 2.2. Objetivos específicos

1. Comparar la eficacia de tres especies de nematodos y cinco dosis de aplicación para el control de gallina ciega.
2. Determinar las dosis y tiempos letales de tres especies de nematodos para causar una mortalidad de larvas de *Ph. vetula* del 50% y 95%.
3. Comparar la eficacia, para el control de gallina ciega (*Ph. vetula*), de tres especies de nematodos, dos formulaciones y dos condiciones de humedad del suelo.
4. Comparar la eficacia, para el control de gallina ciega, de tres momentos de aplicación de los nematodos, dos formulaciones y tres densidades de larvas , bajo condiciones semicontroladas e n campo.
5. Determinar el umbral económico de daño para el control de gallina ciega (*Ph. vetula*) en maíz (*Z. mays*).

### 2.3. Hipótesis nulas

1. Todos los tratamientos (que incluyen como factores la especie de nematodo y la dosis de aplicación en medio acuoso) tienen el mismo efecto en el control de la gallina ciega (*Ph. vetula*).
2. Las tres especies de nematodos en estudio tienen una dosis y tiempo letal iguales para causar una mortalidad de larvas del 50% y 95%.
3. Todos los tratamientos (que incluyen como factores la especie de nematodo, la formulación y la humedad del suelo) tienen el mismo efecto en el control de la gallina ciega (*Ph. vetula*).
4. Todos los tratamientos (que incluyen como factores el momento de aplicación de los nematodos, la formulación y la densidad de larvas presentes en el suelo) tienen el mismo efecto en el control de la gallina ciega (*Ph. vetula*).

## CAPÍTULO III

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El recurso suelo

El suelo es uno de los recursos que en la actualidad se usa intensivamente; con la finalidad de incrementar su productividad y disminuir los riesgos y los daños ocasionados por insectos que en algún estado de su desarrollo viven en el suelo y se alimentan de ciertas partes de la planta cultivada, los productores y los técnicos recurren al uso de diversos productos de síntesis; siendo algunos de ellos muy tóxicos y altamente contaminantes, tanto del suelo como también de los productos agrícolas. Por lo tanto, es prioritario poder contar con los insecticidas alternativos que permitan manejar, con menor impacto al ambiente, las altas poblaciones de insectos plaga, permitiendo además de obtener productos menos contaminados, preservar la diversidad biológica del entorno (Larriva, 2002).

#### 3.2. La plaga de “gallina ciega” (*Phyllophaga* spp.)

Como “gallina ciega” se conocen las larvas de diversas especies de escarábidos de los géneros *Phyllophaga*, *Macroductylus*, *Euetheola*, *Cyclocephala*, *Anomala* y otras que causan serios daños al maíz en el centro de México (Villalobos, 1992); pero, la distribución de “gallina ciega” abarca prácticamente todo el país (SARH, 1988).

En algunas entidades, como Jalisco, se han calculado pérdidas de 920 a 1,600 kg ha<sup>-1</sup> de grano por causa del complejo de insectos rizófagos. La distribución de esta plaga abarca todas las zonas productoras de maíz, con variación en la predominancia de especies en las distintas regiones, su ocurrencia se ha registrado en las siguientes entidades: Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco,

Colima, Michoacán, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Tamaulipas, Chihuahua, Morelos, México, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas. Algunas de las especies mencionadas atacan también a sorgo, caña de azúcar, cafetales, pastos y algunos cultivos hortícolas y ornamentales (SARH, 1988).

Morón (1986) menciona que las especies de *Phyllophaga* spp. muestran una compleja distribución en las montañas y planicies mexicanas, derivada de sus propios movimientos de invasión, de su tolerancia climática y de sus activos procesos de diversificación.

En México, el género *Phyllophaga* se ubica dentro de los más importantes por el daño que causan al sistema radicular de diversos cultivos (Morón, 1983). Se tienen reportadas para este género más de 250 especies (Morón, 1986). El área que afectan se ha estimado que alcanza altas densidades, causando daños en cultivos en 500,000 hectáreas, las cuales están distribuidas en toda la República Mexicana (Romero, 1980). Afectan de manera particular la producción de maíz, las pérdidas en este cultivo son estimadas en 400 a 1,300 kg ha<sup>-1</sup> (Villalobos, 1992).

### **3.2.1. Taxonomía de *Phyllophaga***

Reino: Animal

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Melolonthidae

Subfamilia: Melolonthinae

Tribu: Melolonthini

Subtribu: Rhizotrogina

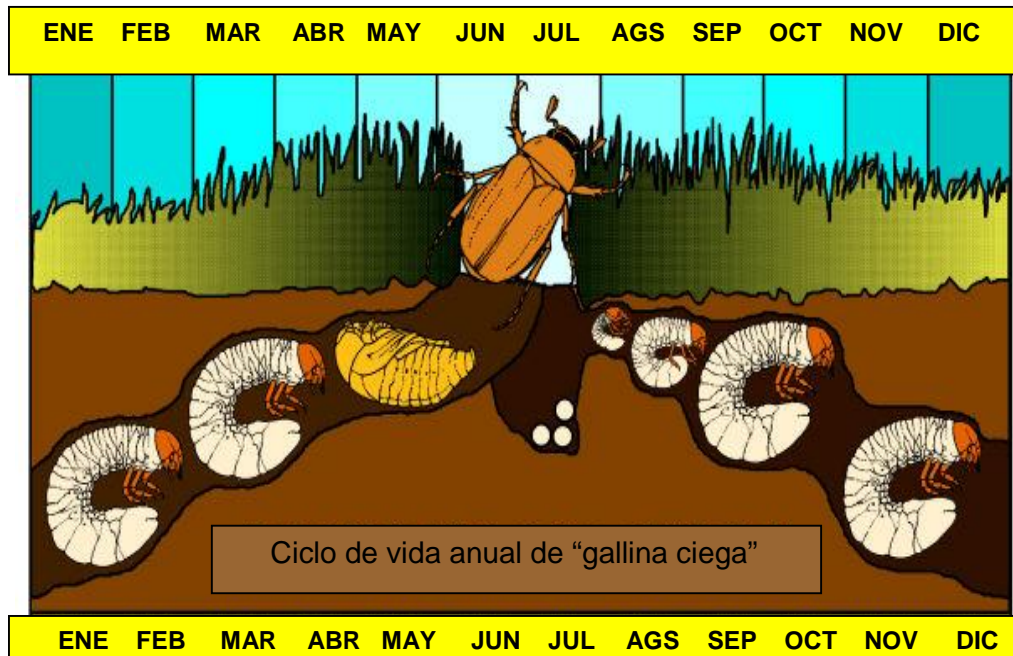
Género: *Phyllophaga*

Especie: spp.

Clasificación según Morón, 1986.

### 3.2.2. Descripción y biología

Las “gallinas ciegas” presentan variantes en su ciclo de vida, encontrándose de ciclo anual (Figura 1), bianual o trianual, dependiendo de la especie. En el estado de Oaxaca predominan diferentes especies de *Phyllophaga*. Los adultos aparecen en los meses de mayo, junio y julio, son de hábitos nocturnos, por lo que en las noches se les observa apareándose y alimentándose del follaje o volando alrededor de lámparas luminosas (SARH, 1988).



**Figura 1.** Ciclo de vida anual de “gallina ciega” (*Phyllophaga* sp.)  
(Tomado de Entomology, 2000)

Al amanecer regresan al suelo, donde las hembras ponen sus huevecillos, que son esféricos, de color blanco aperlado (Figura 2), con un tamaño de 1.5 a 3 mm de diámetro. Éstos son depositados en los suelos húmedos (de siete a 28 huevecillos por insecto), donde permanecen enterrados hasta su eclosión; la incubación dura 15 días, aproximadamente (Metcalf y Flint, 1982).



**Figura 2.** Huevecillos de *Phyllophaga* sp.

Una vez emergida la larva, inmediatamente empieza a causar daño a las raíces de las plantas (aunque es importante mencionar que algunas especies son saprofitas en sus primeros estadios). El cuerpo de la larva es robusto y curvado (Figura 3), con gran cantidad de pliegues transversales, excepto en la región trasera que es casi lisa y brillante, a través de cuya piel se observa una coloración oscura debido al suelo que ingiere junto con las raíces (SARH, 1988).

La larva de primer estadio es de color blanco cremoso y mide alrededor de 5 mm de largo, la de segundo estadio mide aproximadamente 26 mm y la de tercer estadio oscila entre los 30 a 40 mm. Los gusanos de primer estadio se alimentan de raíces y materia orgánica durante un periodo que varía entre 20 y 60 días hasta aumentar de 10 a 15 veces su peso inicial antes de la ecdisis para el segundo estadio, durante el cual incrementan de cinco a siete veces su biomasa en el transcurso de 30 a 60 días. De esta manera la ecdisis para el tercer estadio larval ocurre entre agosto y octubre dando origen a la fase más longeva y voraz de esta especie, que en las zonas tropicales o subtropicales se alimenta durante cuatro a ocho meses y en las zonas templadas y frías durante siete a 14 meses hasta aumentar de seis a ocho veces su peso antes de iniciar

la etapa de prepupa. En estas zonas las larvas de tercer estadio cesan de alimentarse y se inactivan durante parte del otoño y el invierno profundizando hasta 30-40 cm en el suelo para protegerse de las bajas temperaturas y la resequeidad (Morón, 1986). En la primavera suben a la superficie del suelo para alimentarse y completar su desarrollo (Metcalf y Flint, 1982).



**Figura 3.** Larva, pupas y adulto de *Phyllophaga* sp.

El estado larvario dura alrededor de nueve meses o más según la especie (SARH, 1988). Durante la primavera las larvas de tercer estadio delimitan una celda o cámara ovoide, compactando con sus excrementos las partículas del

suelo a una profundidad de 15 a 20 cm, en la cual expulsan todo el contenido del aparato digestivo y se inmovilizan como prepupa durante una o dos semanas antes de la ecdisis que da origen a la pupa exarada. El color de la pupa es blanco cremoso (Figura 3), amarillo o marrón. La etapa de pupa dura de tres a seis semanas al cabo de la cual emerge el adulto. (Morón, 1986). El imago permanece dentro de la celda en tanto madura su aparato reproductor y se incrementan la humedad y la temperatura para realizar sus primeras actividades en el exterior. La longevidad de los adultos varía entre ocho y 30 días aún cuando las hembras de algunas especies pueden sobrevivir más de dos meses. Los adultos son conocidos comúnmente como escarabajos, presentan un color brillante rojizo- marrón (Figura 3) a negro, miden de 19 a 26 mm de largo, con cuerpo ovalado y robusto (Morón, 1986).

### **3.2.3. Daños causados**

La gallina ciega se encuentra entre los insectos del suelo más destructores y problemáticos. Los adultos son una plaga importante que ataca el follaje de numerosas plantas frutales, forrajeras y de ornato, alimentándose también de flores, néctar y polen. Las larvas tienen aún mayor importancia económica, puesto que se alimentan de numerosas especies de plantas, causando su deterioro en grandes áreas. Entre los muchos ejemplos de cultivos afectados están los pastos, rosales, plántulas de vivero, fresa, maíz, camote, durazno, manzano, betabel y espinaca (Morón, 1986). Afecta también a otros cultivos de importancia económica como frijol, sorgo, trigo, jitomate y chile (Saunders, 1998). Se ha reportado como plaga en café (González, 1989) y en la caña de azúcar (Wilson, 1969). Cuando se siembran con maíz los campos infestados con gallina ciega, generalmente brotan las plantas pero dejan de crecer después de alcanzar una altura de 20 a 60 cm. El maíz mostrará un crecimiento poco uniforme con áreas de tamaño variable, donde las plantas están muertas o secándose, debido a que las larvas se alimentan de las raíces (Metcalf y Flint, 1982). Las plantas de maíz presentan amarillamiento de las hojas, retraso en el crecimiento y pérdida de vigor; además, las heridas producidas en la raíz son vías de entrada de diversos microorganismos causantes de enfermedades (SARH, 1988).



En los Valles Centrales de Oaxaca se cultivan anualmente unas 110,000 hectáreas de maíz, siendo la “gallina ciega” una de las principales plagas del suelo en este cultivo. El daño se presenta en manchones desde las etapas tempranas de desarrollo, adquiriendo las plantas coloraciones violetas debido a la deficiencia inducida de fósforo por daño radicular y mostrando poco vigor y marchites (Ruiz *et al.*, 1998). La mayoría de los campesinos producen para autoconsumo, por lo que deben buscarse alternativas de control de bajo costo y ambientalmente inocuas. El control biológico de la plaga a base de nematodos y hongos entomopatógenos es una alternativa al uso de insecticidas sintéticos (Ruiz *et al.*, 2000).

En los Valles Centrales de Oaxaca, Ruiz *et al.* (1998) aislaron dos cepas de nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, concluyendo que tienen potencial para el control de “gallina ciega”.

### **3.3. Alternativas para el control de plagas**

El desarrollo de resistencia de los insectos a los plaguicidas ha estimulado el interés de usar medios biológicos para reducir las poblaciones de plagas. A partir de la década de los años 1980, el uso potencial de los nematodos entomopatógenos adquirió un papel relevante en el control microbiano, similar al de las bacterias, virus, protozoarios y hongos (Aguirre y Salazar, 1999).

#### **3.3.1. Nematodos entomopatógenos**

Entre las alternativas de manejo de plagas más amigables con el ambiente se cuenta hoy en día con los agentes entomopatógenos, es decir, microorganismos que causan enfermedades a los insectos, como son las bacterias, hongos, virus y nematodos; siendo los nematodos los organismos que en la última década han cobrado gran importancia por su facilidad para ser aplicados en el suelo, su alta virulencia y patogenicidad y su relativa facilidad para ser multiplicados en forma masiva y comercializados (Larriva, 2002).

### **3.3.1.1 Taxonomía de los nematodos entomopatógenos**

Los nematodos se encuentran ubicados en el Phylum Nematoda, el cual se subdivide en las clases Secernentia y Adenophoria ( Poinar, 1975, 1990). Los nematodos entomopatógenos conocidos, o bien los que tienen posibilidades de control biológico se encuentran en cuatro órdenes, por importancia, Rhabditida, Mermitida, Tylenchida y Aphelenchida (Smart y Nguyen, 1994).

Dentro del orden Rhabditida se encuentra la mayoría de nematodos de vida libre incluyendo a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, parásitos facultativos de insectos (Tanada y Kaya, 1993). La familia Steinernematidae comprende dos géneros; *Steinernema* Travassos, 1927 (Hominick *et al.*, 1997) y *Neosteinernema* Smart y Nguyen, 1994 (Smart y Nguyen, 1994). La familia Heterorhabditidae comprende el género *Heterorhabditis*.

### **3.3.1.2. Morfología**

Los nematodos son definidos generalmente como gusanos invertebrados que poseen un cuerpo no segmentado, con un tracto digestivo completo. Por “tracto digestivo completo” se entiende una boca, un canal alimenticio y un ano (Gaugler, 1999). No tienen una respiración o sistema circulatorio especializado, sin embargo, poseen sistemas nervioso y excretor bien desarrollados y un juego de músculos longitudinales (Georgis, 1991).

### **3.3.1.3. Comportamiento**

Algunas especies de nematodos prefieren buscar sus hospederos cerca de la superficie del suelo, por ejemplo, *S. carpocapsae*, pero otras se han adaptado para buscar en perfiles más profundos del suelo, como *H. bacteriophora* (Kaya y Gaugler, 1993). Una vez que el hábitat ha sido seleccionado, los nematodos entomopatógenos pueden adoptar una de las dos estrategias de búsqueda: a) emboscar a su presa; b) movilizarse hacia su presa (Kaya y Gaugler, 1993).

En el primer caso se trata por lo tanto de nematodos poco móviles y que ahorran energía mientras esperan que su presa venga hacia ellas, sin embargo, presentan el inconveniente de no seguir a su hospedero cuando éste se encuentra en un estado de desarrollo inmóvil, como en el caso de la pupa, de ahí que la única posibilidad para que se ponga en contacto con el insecto es cuando éste pasa cerca de él o se alimenta de algún sustrato en el cual se encuentra presente (Kaya y Gaugler, 1993). En cambio, los nematodos que buscan a su presa son altamente móviles y responden fuertemente a los estímulos químicos emitidos por el hospedero, funcionando éstos como atrayentes; estas especies estarían mejor adaptadas para parasitar hospederos subterráneos sedentarios (Kaya y Gaugler, 1993).

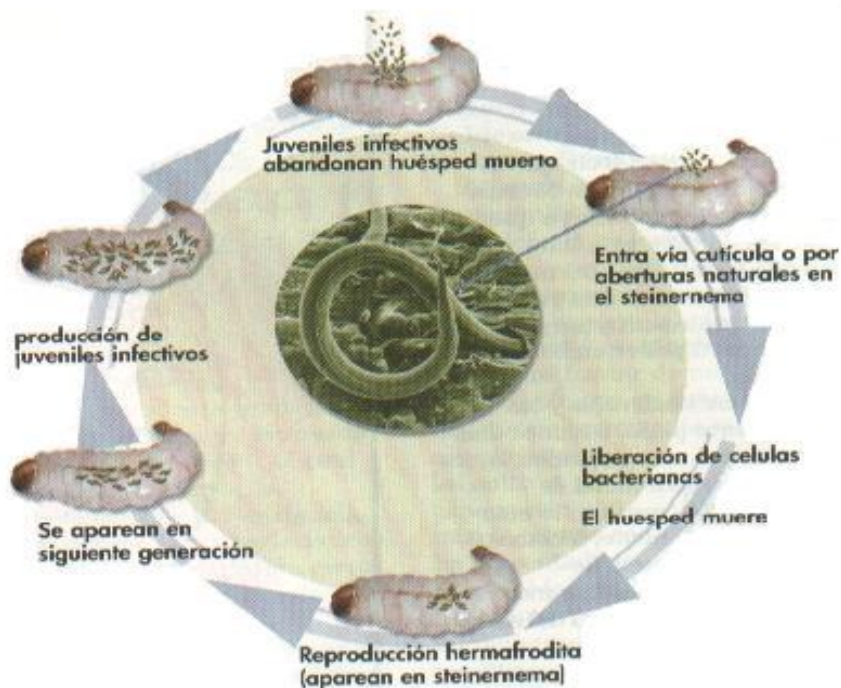
Al respecto, Cui *et al.* (1993) mencionan que los juveniles de *S. glaseri* y *H. bacteriophora* son altamente móviles y buscan activamente a los hospederos, siendo más eficaces contra presas subterráneas sedentarias (Gaugler *et al.*, 1989). En contraste, los juveniles de *S. carpocapsae* parecen tener una estrategia emboscadora (posarse y esperar) y son más efectivos contra presas móviles que habitan la superficie (Kaya y Gaugler, 1993). Sin embargo, estas especies acechadoras tendrán más dificultad en localizar los hospederos, principalmente a los sedentarios, tales como los gusanos blancos (Lewis *et al.*, 1992). Mientras que *S. feltiae* presenta características intermedias, entre buscadores y emboscadores, es decir, comparte características con ambos grupos (Grewal *et al.*, 1994).

#### **3.3.1.4. Ciclo biológico**

Tanto los steinernemátidos como los heterorhabdítidos tienen un ciclo de vida similar (Figura 4). El ciclo biológico de los nematodos y la bacteria simbiote inicia cuando los nematodos juveniles infectivos (que no se alimentan) buscan fuera del cuerpo de su hospedero (insecto) iniciar una nueva infección, para lo cual lo primero que hacen es localizar el huésped. Cuando ha sido localizado, el nematodo penetra en la cavidad del cuerpo del insecto; lo que hace usualmente por las aberturas naturales del cuerpo como la boca, el ano, los espiráculos, así como por las partes delgadas de su cutícula. Los géneros de

bacterias asociados con los nematodos son *Xenorhabdus* en el caso de los steinernemátidos y *Photorhabdus* en heterorhabdítidos (Akhurst, 1980).

Una vez en el interior, el nematodo se ubica en el hemocele (cavidad interior del cuerpo del insecto); la bacteria es liberada desde el intestino del nematodo, misma que se multiplica rápidamente causando la muerte del hospedero en poco tiempo (24 a 48 horas) debido a una septicemia generalizada; el nematodo se alimenta después de los desechos del cuerpo del insecto, ingiriendo también las células bacterianas; alcanzando allí su estado maduro (Gaugler, 1999). Los estados juveniles infectivos de los steinernemátidos pueden llegar a ser machos o hembras, a diferencia de los heterorhabdítidos que se desarrollan en el interior como hermafroditas; no obstante, la subsiguiente generación dentro de un hospedero produce machos y hembras; el ciclo biológico es completado en pocos días y cientos de miles de nuevos juveniles infectivos emergen del cadáver del hospedero (Kaya y Gaugler, 1993).



**Figura 4.** Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos ( Tomado de Dirt Works, 2001).

Cuando los nematodos infectivos juveniles (IJ) salen del hospedero, se mueven dentro del suelo buscando una nueva presa para infectarla. La textura, humedad y temperatura de éste afectan su dispersión e infectividad (Marh, 2001).

### **3.3.1.5. Cría masiva**

Los nematodos entomopatógenos pueden ser multiplicados *in vivo* en un insecto hospedero o *in vitro*, ya sea en un medio semisólido tridimensional o en un fermentador líquido. Todas las especies de Steinernematidae y Heterorhabditidae pueden ser multiplicadas en insectos (Sirjusingh *et al.*, 1990).

La polilla de la cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), habita en las colmenas. Es responsable de grandes pérdidas en los apiarios a través del mundo, causando grandes daños en climas tropicales. Bajo condiciones naturales las larvas se alimentan en los panales, donde se desarrollan hasta el estado adulto. Bajo condiciones de laboratorio las larvas son fácilmente criadas en cera y polen; su desarrollo, que puede mostrar grandes variaciones, ha sido estudiado intensamente. La producción masiva de *G. mellonella* no necesita requerimientos especiales y se usa generalmente con fines limitados en la investigación y en bioensayos de laboratorio. Una larva de *G. mellonella* puede producir hasta 200,000 juveniles infectivos de nematodos. La producción *in vitro* necesita tomar en consideración la asociación con la bacteria simbiote respectiva. Todos los Heterorhabditidae y los Steinernematidae pueden ser multiplicados en un medio tridimensional, el cual consiste de una esponja impregnada en un medio nutritivo. El procedimiento requiere de varios equipos como: cámara de flujo laminar, autoclave, agitador, frascos Erlenmeyer, etc. (Bonifasi y Neves, 1990).

En este caso, debe ajustarse el método a las condiciones particulares de cada especie. Se producen grandes cantidades de nematodos, cerca de 25 millones de nematodos infectivos por Erlenmeyer, los cuales pueden ser usados en pruebas de campo o en pequeñas parcelas experimentales. La producción por

fermentación es capaz de producir vastas cantidades de nematodos, los cuales podrán ser comercializados para ser aplicados en cualquier explotación agrícola. Los estudios más avanzados al respecto se encuentran en Francia y Portugal. Sin embargo, esta técnica requiere equipos muy especializados y costosos (Bonifasi y Neves, 1990).

Para mantener una producción de nematodos entomopatógenos en el laboratorio es necesaria la cría de un hospedero de los mismos, que nos permita obtener grandes cantidades del tercer estadio de los juveniles, el cual es el estadio infectivo. Varios hospederos alternativos se conocen para este fin, entre ellos *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidóptera: Noctuidae) y *Amyelios transitella* Walker han sido usados para la cría de nematodos de una manera económica. Sin embargo, la polilla de la cera, *G. mellonella*, es la más comúnmente usada, debido a que se consigue con facilidad en los apiarios, es muy susceptible a la infección por el nematodo y muestra una diagnosis muy fácil de los síntomas de infección, así como la facilidad de criarla en el laboratorio sin equipos costosos (Sirjusingh *et al.*, 1990).

#### **3.3.1.6. Rango de hospederos**

Los nematodos entomopatógenos presentan un potencial para el control de insectos plaga, éstos invaden y matan un gran número de especies de insectos, especialmente de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera, tanto en laboratorio como en campo. Sin embargo, se observa una relación estrecha entre el nematodo y el insecto, lo que sugiere una susceptibilidad particular del insecto, que se refleja en la variabilidad de la virulencia de la cepa o aislamiento del nematodo (Simoes y Rosa, 1996).

El éxito de los nematodos entomopatógenos para el control del hospedero resulta de una interacción compleja con los mecanismos de defensa de este último, la cual define la especificidad de la relación hospedero -patógeno. Los mecanismos de infección y patogenicidad juegan un papel importante en la especificidad del nematodo entomopatógeno. Existe información que muestra

un patrón de virulencia distinto de una especie o cepa de nematodos contra un insecto particular cuando se compara con otra especie o cepa (Simoes y Rosa, 1996).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae han sido ampliamente estudiadas como potenciales biocontroladores de chizas rizófagas (larvas de coleópteros), debido a su amplio rango de hospederos, gran capacidad de búsqueda, alta virulencia, su facilidad para ser reproducidos masivamente y sobretodo, porque no ocasionan problemas al ambiente (Klein, 1990).

### **3.4. Uso de nematodos entomopatógenos (NE) como agentes de control biológico en México**

En México son pocas las experiencias documentadas sobre el uso de nematodos como agentes de control biológico de insectos plaga. Los trabajos existentes se han enfocado a dos líneas de investigación: una que involucra la búsqueda de nuevos aislamientos, y otra el control de plagas de suelo, para lo cual se realizan pruebas de campo para determinar la efectividad de especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis*, algunas de las cuales ya se producen de manera comercial (Alatorre, 1999).

En la agricultura mexicana, el uso generalizado de los nematodos para el control de insectos se ha visto limitado, principalmente por la falta de disponibilidad en el mercado nacional de productos formulados a base de estos organismos entomopatógenos (Alatorre, 1999).

En el control de gallina ciega, el uso de microorganismos que han coevolucionado con la plaga se perfila como una práctica promisoriosa, especialmente aquellos reconocidos por su capacidad para causar enfermedades crónicas y muerte, tanto a los estadios larvales como a los adultos de *Phyllophaga* spp. Muchos de estos microorganismos han mostrado ser capaces de causar epizootias que mantienen naturalmente controladas las poblaciones de larvas de escarabeidos en el campo (Hidalgo, 2001).

Ciertas especies o razas de nematodos han sido identificadas para el control de algunos insectos que atacan cítricos, pastos, ornamentales, entre otros. Resultados favorables se han obtenido conociendo la biología del insecto, mejorando la dosis, el momento oportuno de aplicación; un aspecto importante es que las estrategias de aplicación permitan el contacto del nematodo con el insecto, específicamente para aquellos que no se desplazan (Alatorre y Guzmán, 1999).

De acuerdo con experimentos realizados por Melo *et al.* (2005), se considera al segundo estadio de la plaga *Phyllophaga* spp. como el momento idóneo para ejercer el control con nematodos entomopatógenos.

Alatorre y Guzmán (1999) mencionan que los nematodos entomopatógenos tienen ciertas ventajas sobre los insecticidas sintéticos. Por ejemplo, estos organismos son ambientalmente seguros y aceptables y buscan activamente a su huésped; debido a esta característica, han demostrado tener una alta capacidad en el control de insectos barrenadores y algunas plagas del suelo .

Si se desea explotar a los nematodos entomopatógenos en el suelo, necesitamos entender sus interacciones en este ambiente. Este conocimiento constituirá la base para estudios futuros sobre la dinámica poblacional y la epizootiología de la enfermedad causada por los nematodos; esta información permitirá optimizar el potencial de estos organismos en el control de insectos del suelo (Alatorre y Guzmán, 1999).

En el manejo de las especies plaga, es importante conocer los alcances y limitaciones de los patógenos y su manera de interacción con la población de plaga hospedera. Su conocimiento proporciona grandes oportunidades para su uso como reemplazo de los plaguicidas sintéticos (Jackson, 2003).

Los nematodos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae portan bacterias que son liberadas dentro del hospedante. La multiplicación de estas bacterias causa la muerte del insecto y a la vez le permite al nematodo completar su ciclo de vida, generando infectivos juveniles que saldrán en busca



de nuevas presas. Una ventaja de los nematodos es su movilidad, que se traduce en capacidad para buscar las larvas de *Phyllophaga* en el suelo (Aguirre y Salazar, 1999).

Existen métodos de producción masiva y formulación de estos organismos que han permitido la generación de productos comerciales para otras plagas. Pese a que hay muchos resultados promisorios contra *Phyllophaga* a nivel de laboratorio, su uso en el campo tiene limitaciones biológicas y técnicas que deben superarse (Hidalgo, 2001).

Kaya y Koppenhöfer (1999) hacen mención de varios aspectos que afectan el buen desempeño de los nematodos, tales como: extensión del área que ocupa la plaga, hábitat en que se desarrolla y estado de desarrollo en que es susceptible al ataque del nematodo; ante ello, es necesario desarrollar innovaciones que permitan aumentar el uso de nematodos entomopatógenos para el control de plagas, dependiendo de las condiciones particulares que se presenten.

De acuerdo con Burges (1998), algunos organismos que han sido muy efectivos en el laboratorio pueden todavía fallar en condiciones de campo, debido a una formulación deficiente. La formulación de bioinsecticidas es tan importante como la ingeniería genética en el desarrollo de microorganismos para el control de plagas en la agricultura y la silvicultura.

El corto periodo de vida de anaquel de los nematodos es el principal factor limitante para una explotación comercial más generalizada de estos agentes de biocontrol (Strauch *et al.*, 2004).

Alatorre (1999) menciona que, hasta la fecha, los ensayos realizados con nematodos entomopatógenos han sido del tipo ensayo-error, la dificultad de predecir el comportamiento de estos organismos en el campo ha sido uno de los mayores obstáculos. Es obvio que aún hay mucho por investigar, a medida que entendamos la ecología de estos entomopatógenos y la relación con sus

huéspedes, se podrán usar de manera más efectiva y en forma selectiva contra diversas plagas de insectos. Los nematodos poseen un alto potencial que contribuye al desarrollo teórico y práctico del control microbiano.

Hidalgo (2001) establece que, pese a los esfuerzos en la investigación en el control biológico de *Phyllophaga*, aún se está en una fase incipiente en lo referente al desarrollo de productos formulados de eficacia aceptable. Sin embargo, se ha demostrado el potencial de algunos microorganismos y la necesidad de usarlos en combinación con otras prácticas que permitan mejorar el control de la plaga.

El futuro de los nematodos entomopatógenos como insecticidas biológicos es excelente. Los nematodos tienen algunas ventajas como agentes de control sobre los plaguicidas sintéticos, no contaminan y son seguros para el 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).

Es absurdo pensar que los nematodos sean la panacea para solucionar el problema de las plagas de insectos en la agricultura y otros sectores, pero bien se pueden constituir en una estrategia y alternativa novedosa dentro de un verdadero programa de Manejo Integrado de Plagas (Larriva, 2002).

Sin duda alguna, la fusión de esfuerzos interinstitucionales pone de manifiesto que las masas críticas presentan divergencias en la construcción de los conceptos, pero tienen los mismos focos de atención: la conservación de la biodiversidad, el control microbiano de los insectos plaga, la reducción de los plaguicidas en las actividades agrícolas, enfatizando siempre el manejo sostenible de los recursos (Aguirre y Salazar, 1999).

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Área de estudio**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico y en el Campo Experimental pertenecientes al 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). Las coordenadas geográficas del CIIDIR son: 17° 02' de latitud norte y 96° 44' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich, y se encuentra a una altitud de 1,550 msnm (IN EGI, 2001).

Para cumplir con los objetivos de investigación establecidos en el presente trabajo, se establecieron tres experimentos. Cada uno de ellos se detallará de manera precisa, antes de ello se mencionarán aspectos generales que tienen relación con todos los experimentos.

#### **4.2. Semilla de maíz utilizada en los experimentos**

La semilla de maíz que se utilizó en los experimentos fue el criollo “bolita” de Valles Centrales, proveniente de la comunidad de Reyes Mantecón, Oaxaca. No se le aplicó a la semilla ningún tratamiento antes de utilizarla en los experimentos, para evitar que los residuos químicos de determinado producto pudieran interferir en el desarrollo del experimento, al afectar a los organismos que se utilizaron en éste. La semilla seleccionada provino de las mazorcas más grandes obtenidas durante la cosecha, y que además estuvieran libres de daños físicos causados por plagas o por el manejo y sin presencia de hongos o indicadores de alguna enfermedad. Una vez que se seleccionaron las mazorcas, se desgranaron y las semillas se mantuvieron en recipientes cerrados para evitar la presencia de organismos nocivos, como es el caso de los insectos plaga de la semilla.

#### **4.3. Obtención de material biológico de gallina ciega ( *Phyllophaga vetula* )**

Debido a que la plaga de gallina ciega es un complejo que incluye varios géneros y especies, y ante la necesidad de obtener resultados precisos, se determinó trabajar exclusivamente con la especie *Phyllophaga vetula*. Para ello se realizaron colectas en campo colocando trampas de luz tipo Luiz de Queiroz (Badilla y Chacón, 1994), las cuales se prendían por las noches para atrapar a los insectos, dado que la plaga en estudio tiene hábitos nocturnos y es atraída por la luz. Al amanecer se colectaban los ejemplares de *Ph. vetula* que habían caído por la noche, separándolos de las demás especies que también habían quedado atrapadas. Posteriormente se colocaban en paneras que contenían suelo húmedo y pasto con raíces para que se alimentaran y ovipositaran. Cuando las larvas emergidas de los huevecillos alcanzaron un tamaño aproximado de 1 cm de largo, se colocaron en vasos de plástico de 100 mL que contenían suelo húmedo y una semilla de maíz, la cual se había colocado previamente y que al germinar y producir raíces sirvió de alimento a la larva. Se colocó una larva por vaso para evitar el canibalismo. Los vasos se regaron constantemente para mantener la humedad; en caso de que la planta ya se hubiera secado por efecto del consumo de la raíz por parte de la larva, se agregaba otra semilla de maíz. Así se mantuvo la larva hasta llegar al segundo estadio que fue la etapa en que se utilizó para los experimentos.

#### **4.4. Mantenimiento de la colonia de *Galleria mellonella***

La reproducción de los nematodos entomopatógenos fue *in vivo*, utilizando como hospedero a la palomilla de la cera (*Galleria mellonella*), la cual fue colectada en el apiario de la Escuela Secundaria Técnica No. 14 de Reyes Mantecón, Oax. en estado de larva.

Posteriormente se colocaron en paneras (Recipientes de plástico de 30 cm de largo x 20 cm de ancho x 15 cm de profundidad) a cuya tapa se le hicieron pequeñas perforaciones para permitir el intercambio gaseoso (Figura 5), las cuales contenían la siguiente dieta:

Miel de abeja	97.5 mL
Glicerol	120 mL
Salvado estéril	37.5 g
Cereal de arroz (cereal Infantil, 1ª etapa)	300 g
Levadura	75 g

(Tomado de Ibarra, 1998)

La forma de preparar la dieta fue la siguiente:

- 1) Se mezcló el cereal de arroz con el salvado estéril.
- 2) Se agregó la levadura y se mezcló bien.
- 3) Una vez hecha la mezcla de los ingredientes secos se agregó poco a poco el glicerol, mezclándose bien (de preferencia hacerlo con la mano).
- 4) Una vez hecho esto se agregó la miel (siempre al final) y se terminó de mezclar hasta homogeneizar perfectamente.
- 5) En ocasiones se le agregó a la dieta restos de panales de apiario para facilitar la adaptación de la larva y obtener mejores resultados.



**Figura 5.** Larvas de *Galleria mellonella* en dieta artificial.

Las larvas ya dentro de la panera siguieron alimentándose hasta llegar al estado adulto (palomilla), en esta etapa se les colocó servitoallas para que ovipositaran en ellas (Figura 6); posteriormente se recortaron los fragmentos de servitoalla que contenían huevecillos colocándose en dietas frescas para que eclosionaran y siguieran su desarrollo (Figura 7), obteniéndose de esta manera grandes cantidades de larvas para utilizarse como hospederos en la reproducción de los nematodos. De las larvas producidas algunas se apartaron para continuar con el ciclo y mantener la colonia de *G. mellonella*. Fue necesario a intervalos de tiempo introducir larvas colectadas en el apiario para mantener la variabilidad genética de la colonia.



**Figura 6.** Palomillas de *G. mellonella* ovipositando.



**Figura 7.** Huevecillos de *G. mellonella* colocados en dieta fresca para su eclosión y posterior desarrollo (la dieta contiene también restos de panales)

#### **4.5. Origen de los nematodos utilizados en los experimentos**

Los nematodos que se estudiaron fueron: *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*, los dos primeros fueron proporcionados por el Laboratorio de Nematodos Entomopatógenos de la Universidad de Davis California a cargo del Dr. H. K. Kaya; mientras que el último correspondió a un aislado nativo (Ruiz *et al.*, 1998).

#### **4.6. Cultivo de los nematodos**

Los nematodos que se utilizaron para los experimentos fueron reproducidos en laboratorio, bajo la siguiente metodología:

Se colocaron larvas de *G. mellonella* en una caja de Petri debidamente etiquetada, a la cual previamente se le había colocado papel filtro en el fondo (Figura 8). Las larvas, antes de ponerse en cajas de Petri, se sumergieron durante 15 segundos en agua a una temperatura de 57 °C, después de lo cual

se lavaron durante 30 segundos en agua a temperatura ambiente, dicho tratamiento fue con la finalidad de evitar que puparan.



**Figura 8.** Larvas de *G. mellonella* en cajas de Petri para inocularse posteriormente con nematodos.

Enseguida se inocularon con nematodos, aproximadamente 200 nematodos por larva, suspendidos en 600 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de agua, con la finalidad de generar la humedad ideal en el papel filtro, facilitando con ello la movilidad de los nematodos y por consiguiente la infección de la larva.

Después de cinco días de infectadas las larvas, se pasaron a trampas White (Figura 9), es decir, a cajas de Petri con agua, en cuyo interior tenían colocada una caja de Petri de plástico de menor tamaño con papel filtro encima, donde se colocaron las larvas infectadas (los nematodos al emerger de la larva se arrastran por el papel filtro húmedo y llegan al agua de donde son colectados para utilizarse en los experimentos, o bien para almacenarse y tenerlos de reserva). La temperatura de almacenaje en refrigeración fue de 8 °C.





**Figura 9.** Larvas de *Galleria mellonella* en trampas White.

Es importante mencionar que a medida que los nematodos pasan mayor tiempo almacenados van perdiendo su infectividad y virulencia, por lo que se recomienda no utilizarlos para bioensayos después de dos semanas de almacenados. Por lo que es necesario reproducirlos cada vez que se vayan a utilizar; incluso en el momento de realizar los experimentos motivo de esta tesis, fue necesario reproducirlos directamente en larvas de gallina ciega (*Ph. vetula*) para mantener su infectividad y virulencia, puesto que pudo observarse que aún cuando se trataba de nematodos recién cosechados de *G. mellonella*, al parecer perdían su habilidad para infectar a *Ph. vetula*, no así con los nematodos provenientes de reproducción en esta última.

#### **4.7. Formulación de los nematodos**

Se estudiaron dos formulaciones de nematodos: en cadáver infectado de larva de *G. mellonella* y en *pellets* de bentonita, las cuales se compararon con la aplicación del nematodo en medio acuoso.

#### **4.7.1. Formulación en cadáver**

La larva infectada de *G. mellonella* se bañó en una solución de grenetina al 1.5%, la cual actuó como adherente, después se recubrió con bentonita, quedando lista para su aplicación en los experimentos.

#### **4.7.2. Formulación en *pellet***

Primeramente se concentraron los nematodos en solución acuosa de tal manera que cada mililitro de suspensión contuviera 2,500 nematodos, enseguida se tomaron 400 µL con una micropipeta (es decir 1,000 nematodos), se depositaron en bentonita contenida en una caja de Petri, con la humedad producida se moldeó de tal manera que se formara un *pellet* esférico de aproximadamente un centímetro de diámetro, de esta manera se produjo la formulación en *pellet*.

#### **4.7.3. Aplicación en medio acuoso**

En este caso, los nematodos se aplicaron directamente en suspensión acuosa, aplicándose 400 µL (1,000 nematodos) por unidad experimental.

### **4.8. EXPERIMENTO 1**

Con el experimento uno se determinaron los factores: especie de nematodo y dosis más adecuados para el control de gallina ciega, además de establecerse dosis y tiempos letales para cada especie de nematodo estudiado.

#### **4.8.1. Factores en estudio**

Las tres especies de nematodos evaluados fueron: *S. feltiae*, *S. glaseri* y *H. bacteriophora*.

Las cinco dosis de inoculación de nematodos probadas fueron: 50, 100, 200, 500 y 1000 por unidad experimental. Además de un testigo sin aplicación de nematodos.

#### 4.8.2. Procedimiento experimental

Se establecieron en el laboratorio 16 tratamientos (diez unidades experimentales por cada tratamiento, con cuatro repeticiones cada uno), resultantes de la combinación de tres nematodos por cinco dosis, más un testigo con fines de comparación (el testigo tuvo larva de gallina ciega pero no se le aplicaron nemátodos) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Tratamientos aplicados en el experimento uno.

Tratamiento	Nematodo	Dosis	Tratamiento	Nematodo	Dosis
1	Sg	50	9	Hb	500
2	Sg	100	10	Hb	1000
3	Sg	200	11	Sf	50
4	Sg	500	12	Sf	100
5	Sg	1000	13	Sf	200
6	Hb	50	14	Sf	500
7	Hb	100	15	Sf	1000
8	Hb	200	16	T	0

*Sg: Steinernema glaseri, Hb: Heterorhabditis bacteriophora,*

*Sf: Steinernema feltiae.*

T: testigo

Como unidades experimentales se utilizaron vasos de plástico de 100 m L de capacidad, los cuales se llenaron con suelo que previamente fue esterilizado durante dos horas en una autoclave para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para alcanzar la humedad deseada (-0.60 MPa), posteriormente se colocó una larva de gallina ciega en la superficie del suelo de cada vaso, si después de 30 minutos la larva no se introducía en el suelo, se reemplazaba por otra, para asegurar con ello que estuviera en buenas condiciones. Enseguida en cada vaso se sembró una semilla de maíz para que al germinar sirviera de alimento a la larva. Al día siguiente se aplicaron los tratamientos que consistieron en cinco diferentes dosis de nematodos en suspensión acuosa. Con el fin de evitar una pérdida rápida de humedad en los vasos, se cubrieron con papel aluminio

al que se le hicieron pequeñas perforaciones con un palillo para permitir el paso de oxígeno. Cada tres días se ajustó la humedad a las condiciones iniciales.

Cada dos días, durante un mes, se revisaron los vasos para determinar el número de larvas muertas, las cuales se pusieron en una trampa White (la cual se describió en el apartado relativo al cultivo de los nematodos) para determinar si efectivamente habían muerto por infección de nematodos; en cuyo caso emergían éstos de la larva, de lo contrario no había emergencia. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de gallina ciega. Con los datos correspondientes al día diez después de iniciado el experimento se determinó la dosis letal, mientras que con todos los datos recabados durante el mes se determinó el tiempo letal, ambos indicadores se establecieron para cada una de las especies de nematodos y para el 50% y 95% de mortalidad de gallina ciega.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar. En la etapa de análisis de resultados se realizó una prueba de normalidad con el procedimiento Univariate (SAS, 1988) para corroborar si los datos presentaban una distribución normal, condición indispensable para la validez del análisis de varianza; cuando no cumplían con esta condición, se realizaron las transformaciones necesarias para homogeneizar esta distribución y proceder con el análisis de varianza y, en el caso de presentar diferencia significativa entre tratamientos, se procedió con la comparación de medias con la prueba de Tukey, a un  $\alpha = 0.05$  (SAS, 1988).

## **4.9. EXPERIMENTO 2**

En el experimento dos se evaluaron los factores: especie de nematodo, formulación y humedad de suelo por su efecto en el control de gallina ciega.

### **4.9.1. Factores en estudio:**

Las tres especies de nematodos evaluadas fueron: *Steinernema feltiae*, *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora*.

Se probaron dos formulaciones de nematodos: *pellets* de bentonita y cadáver infectado de larva de *Galleria mellonella* y aplicación sin formular en medio acuoso.

Se estudiaron dos condiciones de humedad del suelo: moderada (-0.60 MPa) y alta (-0.08 MPa). Además de dos testigos sin aplicación de nematodos, uno con humedad moderada y otro con humedad alta.

#### 4.9.2. Procedimiento experimental

Se establecieron en el laboratorio 20 tratamientos (diez unidades experimentales por tratamiento con cuatro repeticiones cada uno), resultantes de la combinación de tres nematodos por tres formas de aplicación del nematodo (*pellet*, cadáver y medio acuoso) por dos humedades más dos testigos para efecto de comparación (uno con humedad moderada y otro con humedad alta), los cuales tuvieron larvas de gallina ciega pero no se les aplicó nematodos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Tratamientos aplicados en el experimento dos.

Trat.	Nematodo	Form.	Humedad	Trat.	Nematodo	Form.	Humedad
1	Sf	p	m	11	Sg	c	a
2	Sg	p	m	12	Hb	c	a
3	Hb	p	m	13	Sf	n	m
4	Sf	p	a	14	Sg	n	m
5	Sg	p	a	15	Hb	n	m
6	Hb	p	a	16	Sf	n	a
7	Sf	c	m	17	Sg	n	a
8	Sg	c	m	18	Hb	n	a
9	Hb	c	m	19	Tm	0	m
10	Sf	c	a	20	Ta	0	a

*Sg: Steinernema glaseri, Hb: Heterorhabditis bacteriophora, Sf: Steinernema feltiae.*  
 p: *pellet*, c: cadáver, n: medio acuoso  
 Tm: testigo con humedad moderada, Ta: testigo con humedad alta.  
 m: moderada, a: alta.

Como unidades experimentales se utilizaron vasos de plástico de 100 mL, a los cuales se les agregó 200 g de suelo que previamente fue esterilizado durante dos horas en autoclave para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para alcanzar las dos condiciones de humedad (alta y moderada).

Con el objeto de presentar las dos condiciones de humedad (alta y moderada) en unidades universales, se hizo uso de la curva de humedad presentada por Hamblin en 1981; la cual presenta en el eje de las abscisas los porcentajes de contenido de humedad y en el eje de las ordenadas la tensión del agua expresada en MPa; de tal manera que al interceptar en la curva la humedad alta (20.5% de humedad) correspondió a -0.08 MPa en el eje de las ordenadas, mientras que la humedad moderada (11.8% de humedad) correspondió a -0.6 MPa.

La forma de determinar las dos condiciones de humedad del suelo, fue la siguiente: primeramente se pusieron a secar cinco muestras de suelo de 300 g cada una, en la estufa de secado durante tres días a 80°C, una vez que el suelo estuvo seco se tomaron 200 g de cada muestra y se les agregó agua en abundancia para enseguida dejar drenando hasta que éstas alcanzaron la humedad correspondiente a capacidad de campo (CC), en este momento se pesaron las muestras y se determinó el porcentaje en peso que esta humedad representaba (el promedio fue de 20.5%); esta fue la humedad alta de suelo. Para determinar la humedad baja se consideró aproximadamente la mitad del porcentaje correspondiente a CC, fijándose en 11.8%. Una vez teniendo estos dos porcentajes en peso, se colocó en los vasos de plástico 200 g de suelo; para lograr la humedad alta se le agregó al suelo 20.5% de humedad en peso (41 g de agua que corresponde aproximadamente a 41 mL); para lograr la humedad baja se le agregó al suelo 11.8% de humedad en peso (23.6 g que corresponde aproximadamente a 23.6 mL). En el caso de la humedad alta el peso total del vaso considerando el suelo más el agua fue de 241 g, mientras que en el caso de la humedad baja, el peso total fue de 223.6 g. Cada tres días se chequeaba que los vasos presentaran este peso, agregándose el agua necesaria en caso de que faltara peso, esto con el fin de mantener lo más

constante posible las dos condiciones de humedad. Una vez que los vasos contenían la humedad especificada, se colocó una larva de gallina ciega en la superficie del suelo de cada vaso, si después de 30 minutos la larva no se introducía en el suelo, se reemplazaba por otra, para asegurar con ello que estuviera en buenas condiciones. Enseguida se sembró en cada vaso una semilla de maíz para que al germinar sirviera de alimento a la larva. Con el fin de evitar una rápida pérdida de humedad en los vasos, se cubrieron con papel aluminio al que se le hicieron pequeñas perforaciones con un palillo para permitir el paso de oxígeno. Cada tres días se ajustó la humedad a las condiciones iniciales. Al día siguiente se aplicaron los tratamientos de nematodos (*pellet*, cadáver y medio acuoso), la dosis aplicada fue en el caso de *pellet* uno por vaso, en el caso de cadáver uno por vaso y en el caso de aplicación en medio acuoso 1000 nematodos por vaso.

Diez días después de aplicados los tratamientos de nematodos, las gallinas ciegas fueron extraídas de los vasos y contadas como vivas o muertas. Las muertas fueron puestas en trampa White para determinar si murieron por infección de nematodos o no. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de gallina ciega, por efecto de la aplicación de los tratamientos de nematodos.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar. En la etapa de análisis de resultados se realizó una prueba de normalidad con el procedimiento Univariate (SAS, 1988) para corroborar si los datos presentaban una distribución normal, condición indispensable para la validez del análisis de varianza; cuando no cumplían con esta condición, se realizaron las transformaciones necesarias para homogeneizar esta distribución y proceder con el análisis de varianza y, en el caso de presentar diferencia significativa entre tratamientos, se procedió con la comparación de medias con la prueba de Tukey, a un  $\alpha = 0.05$  (SAS, 1988).

### **4.10. EXPERIMENTO 3**

En el experimento tres se evaluaron los factores: momento de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri*, formulación y densidad de larvas en el suelo, por su efecto en el control de gallina ciega; además de establecerse el umbral económico de daño para esta plaga.

#### **4.10.1. Factores en estudio:**

Se evaluaron tres momentos de aplicación del nematodo *S. glaseri*: planta con siete hojas (V7), planta con ocho hojas (V8) y planta con nueve hojas (V9).

Se probaron dos formulaciones de nematodos: *pellets* de bentonita y cadáver infectado de larva de *G. mellonella*.

Se estudiaron tres densidades de larvas de *Ph. vetula* por planta de maíz (cuatro, ocho y 12), a las que se les aplicó el nematodo. Además de cuatro testigos que correspondieron a plantas de maíz con cero, cuatro, ocho y 12 larvas de *Ph. vetula* por planta, a las que no se les aplicó el nematodo.

En este experimento el nematodo utilizado fue *S. glaseri*, debido a que fue el que presentó los mejores resultados en los experimentos uno y dos.

#### **4.10.2. Procedimiento experimental**

Se establecieron en campo, bajo condiciones semicontroladas, 22 tratamientos, con cuatro repeticiones cada uno, resultantes de la combinación de tres momentos de aplicación del nematodo por dos formulaciones de éste por tres densidades de larvas en el suelo, más cuatro testigos a los que no se les aplicó nematodos (Cuadro 3).

Como unidades experimentales se utilizaron bolsas de plástico de 12 litros de capacidad, las cuales se llenaron con suelo que previamente fue solarizado dentro de plástico transparente durante tres meses para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para humedecer el suelo y se sembraron dos semillas de maíz; cuando las plantitas tenían aproximadamente 12 cm de altura se eliminó una,



cuidando que todas las que quedaran fueran homogéneas en cuanto a altura, número de hojas, coloración y vigor.

**Cuadro 3.** Tratamientos aplicados en el experimento tres.

Trat.	No. de larvas	Control	Form	Trat.	No. de larvas	Control	Form.
1	4	V7	pell	12	8	V9	cad
2	4	V8	pell	13	12	V7	Pell
3	4	V9	pell	14	12	V8	Pell
4	4	V7	cad	15	12	V9	Pell
5	4	V8	cad	16	12	V7	cad
6	4	V9	cad	17	12	V8	cad
7	8	V7	pell	18	12	V9	Cad
8	8	V8	pell	19	0	0	0
9	8	V9	pell	20	4	0	0
10	8	V7	cad	21	8	0	0
11	8	V8	cad	22	12	0	0

Trat.: tratamiento, Form.: formulación.

V7: siete hojas, V8: ocho hojas, V9: nueve hojas.

pell: *pellet*, cad: cadáver.

Cuando las plantas presentaron un número de siete hojas se les colocaron las larvas de gallina ciega, de acuerdo con las densidades previamente establecidas (cuatro, ocho y 12 larvas por planta), esto se hizo tanto para las plantas a las que se les aplicó el nematodo como para las que no se les aplicó, es decir a las plantas testigo. Las larvas que después de 30 minutos no se introducían en el suelo se cambiaban por otras, para garantizar su vigor y sanidad. Un día después de que se colocaron las larvas se llevó a cabo el primer momento de aplicación del nematodo (V7), una semana después el segundo (V8) y dos semanas después el tercero (V9), aplicándose formulado en cadáver y en *pellet* de acuerdo a lo establecido en el experimento. Como éste se llevó a cabo en el periodo de siembra de maíz de temporal de la región, las plantas se mantuvieron con el agua de lluvia.

Las variables respuesta fueron altura de planta, número de hojas, pesos fresco y seco de raíz y follaje; las dos primeras se registraron cada semana, tomando

la primera medición el día que se introdujeron las larvas en las bolsas, de ahí en adelante durante seis semanas y las dos últimas al final del experimento. Para determinar el peso seco de raíces y follaje se introdujeron a una estufa de secado durante 72 horas a 60°C.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar. En la etapa de análisis de resultados se realizó una prueba de normalidad con el procedimiento Univariate (SAS, 1988) para corroborar si los datos presentaban una distribución normal, condición indispensable para la validez del análisis de varianza; cuando no cumplían con esta condición, se realizaron las transformaciones necesarias para homogeneizar esta distribución y proceder con el análisis de varianza y, en el caso de presentar diferencia significativa entre tratamientos, se procedió con la comparación de medias con la prueba de Tukey, a un  $\alpha = 0.05$  (SAS, 1988).

Se realizó un análisis de correlación (SAS, 1988) entre las variables: número de larvas de gallina ciega por planta y porcentaje de pérdida de materia seca, para determinar si era válido generar un modelo que explicara su comportamiento.

A través de regresión lineal (SAS, 1988) se generó un modelo lineal entre las variables mencionadas, de la forma:

$$y = m x + b \quad \text{donde,}$$

- y: porcentaje de pérdida de materia seca
- m: constante del modelo (pendiente de la recta)
- x: número de larvas de gallina ciega por planta
- b: constante del modelo (intercepto con el eje y)

#### **4.10.3. Cálculo del umbral económico (UE)**

Con el apoyo del modelo anterior, con la información generada en laboratorio y campo acerca del costo de aplicar nematodos entomopatógenos para controlar la gallina ciega, y con información proporcionada por el Centro Regional Universitario Sur perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, en

cuanto a producción de forraje y grano de maíz, y valor de estos productos en la región de los Valles Centrales de Oaxaca, se calculó el Umbral Económico para el control de la plaga de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*).

Con el fin de entender el cálculo posterior del UE se presentan las siguientes definiciones.

Umbral de Ganancia (UG).- Reducción en el rendimiento, necesario para pagar el costo de control.

Nivel de Daño Económico (NDE).- Es el número mínimo de insectos o esporas que pueden causar un daño económico (Daño que justifica el control de la plaga).

Umbral Económico (UE).- Nivel de infestación al cual se debe implementar el control de la plaga a fin de evitar llegar al NDE. Normalmente el UE puede considerarse como un 70% del NDE, es decir:

$$UE = 0.7 \times NDE$$

# CAPÍTULO V

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. EXPERIMENTO 1

#### 5.1.1. Mortalidad de gallina ciega por aplicación de nematodos en diferentes dosis

Al realizar la prueba de normalidad de los datos, haciendo uso del procedimiento Univariate (SAS, 1988), se determinó que los datos no seguían una distribución normal, lo cual era de esperarse, puesto que la variable respuesta se midió en porcentajes, y estos no siguen una distribución normal. Por lo tanto hubo que hacer una transformación, aplicándole a los datos el arcoseno, con lo cual se aproximaron a dicha distribución, es necesario mencionar que el análisis de varianza y la comparación de medias se hicieron con los datos transformados, pero los resultados se muestran en las unidades originales (porcentajes), para una mayor comprensión.

Una vez hecho el análisis de varianza para los resultados obtenidos (Anexo 1), se encontró que la diferencia entre tratamientos es altamente significativa ( $p = 0.0001$ ), por lo que se rechaza la hipótesis nula y por lo tanto puede aseverarse que sí hay diferencia estadística en la mortalidad causada por los diferentes tratamientos.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la comparación de medias según Tukey, con un  $\alpha = 0.05$ . El nematodo más eficiente para controlar la plaga fue *S. glaseri*, aplicado en una dosis de 1000 nematodos por vaso, causando una mortalidad de 97.5%, le siguió en orden de importancia *H. bacteriophora*, el cual a la misma dosis que el anterior causó una mortalidad de 87.5%; es importante señalar que aún cuando ambos porcentajes son altos se agrupan en diferente categoría estadística, enseguida se encuentra *S. feltiae* que con una dosis similar produjo un 60% de mortalidad, este último se agrupa

estadísticamente junto con el resultado de aplicar *H. bacteriophora* y *S. glaseri* en dosis de 500 nematodos. Esto quiere decir que la efectividad de *S. feltiae* fue considerablemente menor que los otros dos nematodos.

Las tres especies de nematodos aplicados en dosis de 200, 100 y 50 nematodos por vaso presentaron resultados estadísticamente similares al testigo, puede decirse entonces que estas dosis no son efectivas para causar mortalidad a la gallina ciega.

El éxito de *S. glaseri* y *H. bacteriophora* puede deberse a que tienen hábitos de buscadores, es decir, son altamente móviles y buscan activamente a su presa, por lo que son más efectivos contra plagas subterráneas con hábitos sedentarios, según lo mencionado por Cui *et al.* (1993). Por su parte, *S. feltiae* tiende a esperar a su presa muy cerca de la superficie del suelo, pues posee características intermedias entre emboscadores y buscadores (Grewal *et al.*, 1994).

**Cuadro 4.** Porcentajes de mortalidad de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) observados como resultado de la aplicación de tres especies de nematodos en diferentes dosis.

Nematodo	Dosis	% de mortalidad
<i>Steinernema glaseri</i>	1000	97.5 a <sup>1</sup>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	1000	87.5 b
<i>Steinernema feltiae</i>	1000	60.0 c
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	500	50.0 c
<i>Steinernema glaseri</i>	500	47.5 c
<i>Steinernema feltiae</i>	500	35.0 cd
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	200	17.5 de
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	100	12.5 de
<i>Steinernema feltiae</i>	200	10.0 de
<i>Steinernema glaseri</i>	100	10.0 de
<i>Steinernema glaseri</i>	200	10.0 de
<i>Steinernema glaseri</i>	50	5.0 e
<i>Steinernema feltiae</i>	100	5.0 e
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	50	2.5 e
<i>Steinernema feltiae</i>	50	2.5 e
Testigo	0	2.5 e

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.1.1.1. Análisis de la mortalidad por niveles de los factores

Con la finalidad de determinar con mayor precisión cuales fueron los factores que causaron que hubiera diferencia estadística entre tratamientos se realizó un análisis por factores (Cuadro 5), en el Anexo 2 se muestra el análisis de varianza. En el modelo general como por factores individuales y combinaciones entre éstos se tiene un  $p = 0.0001$ , esto quiere decir que tanto los factores individuales como su combinación causaron la alta significancia.

*S. glaseri* y *H. bacteriophora* produjeron la mayor mortalidad de larvas, siendo similares estadísticamente; mientras que el efecto de *S. feltiae* fue menor.

La mejor dosis de aplicación fue 1000 nematodos, diferenciándose estadísticamente de 500, que es la que le sigue; mientras que 200, 100 y 50 fueron similares en su efecto.

**Cuadro 5.** Mortalidad de gallina ciega por niveles de los factores.

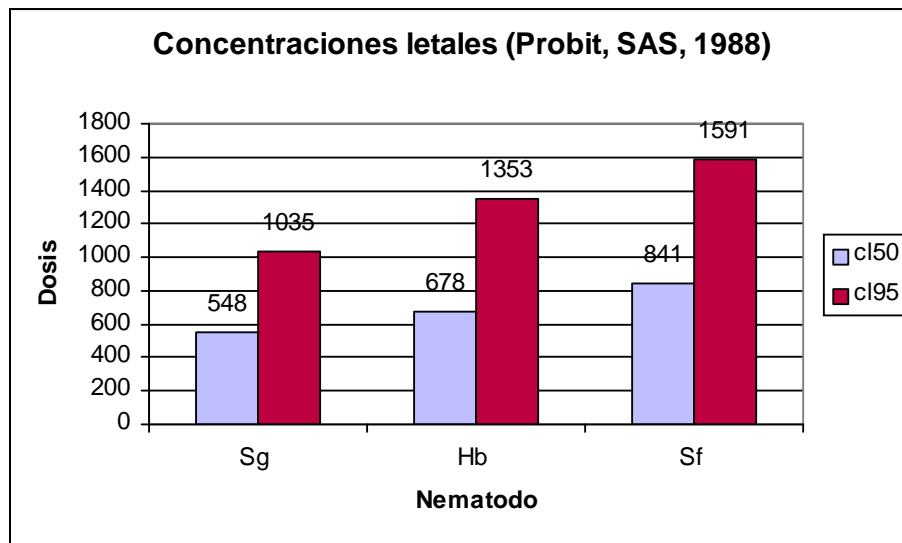
Factor	% de mortalidad	
Nematodo		
<i>Steinernema glaseri</i>	34.0	a <sup>1</sup>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	33.9	a
<i>Steinernema feltiae</i>	23.0	b
Dosis		
1000	81.7	a
500	44.2	b
200	12.5	c
100	9.2	c
50	3.3	c

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

## 5.1.2. Determinación de dosis y tiempos letales

### 5.1.2.1. Dosis letales

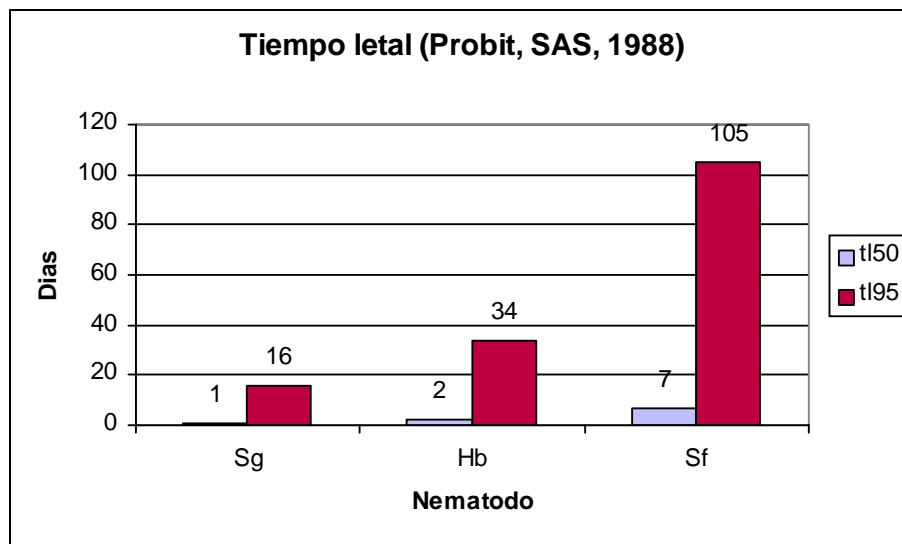
Las dosis letales para causar una mortalidad de larvas de 50% y 95% (DL50 y DL95), calculadas con el análisis Probit (Anexos 3, 5 y 7) se muestran en la Figura 10; *S. glaseri* fue quien presentó los menores valores con una DL50 de 548 nematodos y una DL95 de 1035 nematodos, seguido en orden ascendente por *H. bacteriophora* y *S. feltiae*. Tanada y Kaya (1993) mencionan que tanto en Steinernemátidos como en Heterorhabdítidos son necesarios alrededor de 25 nematodos juveniles infectivos por  $\text{cm}^2$  para realizar una buena infección, por lo que considerando que los vasos utilizados para el experimento tienen un área de  $38.5 \text{ cm}^2$ , se requerirían alrededor de 963 nematodos para infectar a la larva. Por lo tanto, *S. glaseri* es quién se acerca más a esta recomendación. A medida que el nematodo es menos efectivo, requiere de mayores dosis de aplicación para controlar la larva, lo que implica mayores costos, razón por la cual, de acuerdo con estos resultados, *S. glaseri* representa la mejor opción de control.



**Figura 10.** Concentraciones letales de los nematodos *Steinernema Glaseri* (Sg), *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) y *Steinernema feltiae* (Sf)

### 5.1.2.2. Tiempos letales

Los tiempos letales calculados para cada una de las especies se muestran en los anexos 4, 6 y 8. En el caso de *S. glaseri* y *H. bacteriophora* su tiempo letal para matar el 50% de larvas (TL50) es negativo, esto se debe a que el método de análisis considera dos días como la unidad mínima de medida, puesto que es el intervalo de tiempo en que se tomaron las observaciones, y como estos nematodos causaron el 50% de mortalidad en menos de dos días, el modelo ajustado se desplaza hacia la izquierda y los presenta como negativos; esto quiere decir que eliminan con mucha rapidez el 50% de las larvas. Con fines de representación gráfica (Figura 11) se consideró un día como el TL50 para estas especies. Gaugler (1999) menciona que el nematodo puede matar a la larva en un lapso entre 24 y 48 horas, por lo que es factible que haya una mortalidad del 50% en menos de dos días. *S. feltiae* fue más lento para matar a la larva, presentando un TL50 de siete días. Por otra parte, el tiempo letal para matar el 95% de larvas (TL95) fue de 16, 34 y 105 días para *S. glaseri*, *H. bacteriophora* y *S. feltiae* respectivamente. Por lo tanto, analizando la efectividad de las especies con respecto al TL95, el nematodo recomendable para el control de *P. vetula* es *S. glaseri*.



**Figura 11.** Tiempos letales de los nematodos *Steinernema Glaseri* (Sg), *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) y *Steinernema feltiae* (Sf).



## 5.2. EXPERIMENTO 2

Al aplicar la prueba de normalidad con el procedimiento Univariate (SAS, 1988), los datos no presentaron una distribución normal, puesto que la variable respuesta se midió en porcentajes, por lo tanto hubo que transformarlos con arcoseno. Los análisis de varianza y comparación de medias se hicieron con los datos transformados, pero los resultados se presentan en las unidades originales.

El análisis de varianza (Anexo 9) mostró diferencias altamente significativas para los tratamientos ( $p = 0.0001$ ), por lo que se realizó la comparación de medias según Tukey con un  $\alpha = 0.05$  para conocer a detalle esta situación.

### 5.2.1. Mortalidad de gallina ciega por aplicación de nematodos en diferentes formulaciones y condiciones de humedad

*S. glaseri* fue el nematodo más sobresaliente para causar mortalidad a la larva de gallina ciega, el porcentaje más alto (75.0%) lo obtuvo aplicado en medio acuoso y en condiciones de humedad moderada en el suelo, el segundo (55.0%) formulado en cadáver y también en condiciones de humedad moderada y el tercero (30.0%) aplicado en medio acuoso y en condiciones de humedad alta (Cuadro 6). Estadísticamente, el resultado de aplicar *S. glaseri* en medio acuoso difiere de su aplicación en cadáver, ambos aplicados en humedad moderada del suelo; siendo superior el efecto en el primer caso. *H. bacteriophora* y *S. feltiae* en sus tres formas de aplicación y en las dos condiciones de humedad se agrupan estadísticamente junto con los dos testigos, por lo que se concluye que no tuvieron éxito para el control de la gallina ciega.

Los resultados que se mencionan en cuanto a la superioridad de la aplicación del nematodo en medio acuoso comparada con la formulación en cadáver, contrastan con lo mencionado por Shapiro y Glazer (1996), en el sentido de que la aplicación de los nematodos formulados en cadáver puede dar mejores resultados que la aplicación en suspensión acuosa, al parecer, esta diferencia

se debe al recubrimiento que se le hizo a los cadáveres con bentonita para facilitar su manejo, es decir para evitar que se pegaran entre sí y se rompieran, problemática que también menciona Koppenhofer (2000). La bentonita al humedecerse formó un gel que limitó la salida de los nemátodos de la larva, aunque como la cubierta que se formó no fue uniforme, quedando algunos espacios sin cubrir, sobre todo en los pliegues de la larva, si se dio cierta emergencia de nematodos aunque no completamente. La formulación en *pellets* no tuvo éxito en el control de la larva; debido a la barrera física formada por la bentonita hidratada. Pudo comprobarse posteriormente, mediante pruebas de laboratorio, que la bentonita hidratada forma un gel que impide el movimiento de los nematodos, dificultando su salida del *pellet*.

**Cuadro 6.** Porcentajes de mortalidad de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) observados como resultado de la aplicación de tres especies de nematodos en diferentes formulaciones y condiciones de humedad

Nematodo	Forma de aplicación	Humedad	% de mortalidad	
<i>Steinernema glaseri</i>	Medio acuoso	Moderada	75.0	a <sup>1</sup>
<i>Steinernema glaseri</i>	Cadáver	Moderada	55.0	b
<i>Steinernema glaseri</i>	Medio acuoso	Alta	30.0	c
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Cadáver	Alta	22.5	cd
<i>Steinernema glaseri</i>	Cadáver	Alta	17.5	cd
Testigo	-----	Moderada	15.0	cd
<i>Steinernema feltiae</i>	Cadáver	Alta	15.0	cd
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Medio acuoso	Alta	12.5	cd
<i>Steinernema glaseri</i>	<i>Pellet</i>	Alta	10.0	cd
Testigo	-----	Alta	10.0	cd
<i>Steinernema glaseri</i>	<i>Pellet</i>	Moderada	10.0	cd
<i>Steinernema feltiae</i>	<i>Pellet</i>	Alta	5.0	d
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Cadáver	Moderada	5.0	d
<i>Steinernema feltiae</i>	Medio acuoso	Moderada	5.0	d
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Pellet</i>	Alta	5.0	d
<i>Steinernema feltiae</i>	Medio acuoso	Alta	5.0	d
<i>Steinernema feltiae</i>	Cadáver	Moderada	2.5	d
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Medio acuoso	Moderada	2.5	d
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Pellet</i>	Moderada	2.5	d
<i>Steinernema feltiae</i>	<i>Pellet</i>	Moderada	0.0	d

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).  
Humedad moderada: -0.60 MPa, humedad alta: -0.08 MPa.

Pruebas de laboratorio nos mostraron que la arcilla comercial que se utiliza para mascarillas de limpieza en el rostro, puede ser un buen material para

formular los nemátodos en *pellets*, pues no limita su desplazamiento una vez que el *pellet* se hidrata; también puede servir para cubrir las larvas infectadas, lo cual evita que se peguen entre sí, facilitando con ello su manejo.

### 5.2.1.1. Análisis de la mortalidad por niveles de los factores

Al realizar un análisis del experimento por factores (Anexo 10), se encontró que tanto a nivel individual como la combinación de éstos presentan alta significancia ( $p = 0.0001$ ), a excepción del factor humedad, que presentó un valor de 0.0155, aunque aún así sigue siendo significativo. Los resultados de la comparación de medias se muestran en el Cuadro 7. Con relación a especie de nematodo, *S. glaseri* provocó la mortalidad más alta, diferenciándose estadísticamente de *H. bacteriophora* y *S. feltiae*. En cuanto a forma de aplicación, no hubo diferencia estadística entre medio acuoso y cadáver, lo que indica que estadísticamente sus resultados son similares, *pellet* fue menos eficiente, ubicándose en un grupo diferente. Con relación a humedad, la moderada presentó los mejores resultados, agrupándose en una categoría estadística diferente de la humedad alta.

**Cuadro 7.** Mortalidad de gallina ciega por niveles de los factores.

Factor	% de mortalidad	
Nematodo		
<i>Steinernema glaseri</i>	32.92	a <sup>1</sup>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	8.33	b
<i>Steinernema feltiae</i>	5.41	b
Forma de aplicación		
Medio acuoso	21.67	a
Cadáver	19.58	a
<i>Pellet</i>	5.42	b
Humedad		
Moderada	17.50	a
Alta	13.61	b

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.3. EXPERIMENTO 3

Al realizar la prueba de normalidad de los datos con el procedimiento Univariate (SAS, 1988) se determinó que los datos de las variables respuesta (número de hojas, altura de planta, peso fresco y seco de follaje y raíz), sí siguen una distribución normal, por lo que no hubo necesidad de transformarlos para realizar los análisis de varianza y comparación de medias.

#### 5.3.1. Altura de plantas de maíz

El análisis de varianza para la altura de plantas de maíz (Anexo 11) muestra que la diferencia entre los tratamientos fue altamente significativa ( $p = 0.0001$ ).

La mayor altura en plantas (253.7 cm) la presentó el tratamiento testigo que no incluyó larvas (Cuadro 8); sin embargo, los tratamientos que incluyeron una densidad de cuatro larvas de *Phyllophaga vetula* por planta de maíz, formulación del nematodo *Steinernema glaseri* en cadáver y aplicación de éste en las etapas de siete y ocho hojas (V7 y V8) presentaron resultados similares estadísticamente al testigo, esto es muy importante porque indica de manera indirecta que se puede controlar la plaga siguiendo las especificaciones mencionadas. Cuando el nematodo se aplicó formulado en cadáver a plantas con una densidad de cuatro larvas pero en la etapa de nueve hojas (V9), la altura de planta resultante disminuyó a tal grado que se ubicó en otra categoría estadística, lo cual es indicativo que ya no hubo un control efectivo de la plaga.

De manera general la aplicación del nematodo formulado en cadáver, fue la que produjo las mayores alturas de plantas comparadas con las obtenidas con la formulación en *pellets*, esta última se ubicó en categorías estadísticas similares a los testigos que tuvieron larvas pero no se les aplicó nematodos. En el caso de una densidad de 12 larvas por planta, los resultados en altura obtenidos por los *pellets* en sus tres tiempos de aplicación (V7, V8 y V9) se agrupan en la misma categoría estadística que el testigo que tuvo 12 larvas pero sin aplicación de nematodos, lo mismo sucedió en el caso de las otras dos densidades de larvas (cuatro y ocho), esto nos indica que el nematodo

formulado en *pellet* no funcionó para controlar la plaga, lo cual puede tener su explicación en lo comentado al respecto en el experimento 2.

**Cuadro 8.** Cambios en altura de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Altura (cm)
0	-----	-----	253.7 a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	252.5 a
4	8	cadáver	251.2 a
4	9	cadáver	220.5 b
8	8	cadáver	217.2 b
4	8	<i>pellet</i>	215.0 b
4	-----	-----	214.0 b
4	9	<i>pellet</i>	211.7 b
8	7	cadáver	208.5 b
4	7	<i>pellet</i>	208.2 b
12	7	cadáver	206.5 b
8	9	cadáver	180.2 c
12	8	cadáver	169.5 c
8	7	<i>pellet</i>	168.0 c
8	-----	-----	166.7 c
8	8	<i>pellet</i>	166.2 c
8	9	<i>pellet</i>	166.0 c
12	9	cadáver	162.0 c
12	8	<i>pellet</i>	131.0 d
12	7	<i>pellet</i>	125.0 d
12	9	<i>pellet</i>	123.2 d
12	-----	-----	113.2 d

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.3.2. Número de hojas de plantas de maíz

El análisis de varianza para el número de hojas de plantas de maíz (Anexo 12) muestra que la diferencia entre los tratamientos es altamente significativa ( $F = 0.0001$ ).

Los tratamientos que incluyeron altas densidades de larvas de gallina ciega (12), específicamente el testigo (al que no se le aplicaron nematodos para controlar las larvas) y a los que se les aplicaron formulados en *pellet* (independientemente del momento de su aplicación), presentaron una

disminución en el número de hojas producidas, agrupándose en categorías estadísticas similares (Cuadro 9). Esto muestra que los *pellets* no tuvieron ningún efecto en el control de larvas a altas densidades. El resto de tratamientos produjo un número de hojas similar al tratamiento testigo al que no se le aplicaron larvas de gallina ciega, ubicándose en la misma categoría estadística que este último.

**Cuadro 9.** Cambios en número de hojas de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Número de hojas	
0	----	----	14.00	a <sup>1</sup>
4	7	<i>pellet</i>	14.00	a
4	9	cadáver	14.00	a
4	7	cadáver	14.00	a
4	8	cadáver	14.00	a
4	----	----	14.00	a
4	9	<i>pellet</i>	13.75	a
12	7	cadáver	13.75	a
8	8	cadáver	13.50	a
4	8	<i>pellet</i>	13.50	a
8	7	cadáver	13.50	a
12	8	cadáver	13.25	a
12	9	cadáver	13.25	a
8	----	----	13.00	a
8	7	<i>pellet</i>	13.00	a
8	8	<i>pellet</i>	13.00	a
8	9	<i>pellet</i>	13.00	a
8	9	cadáver	13.00	a
12	7	<i>pellet</i>	11.25	b
12	8	<i>pellet</i>	10.75	bc
12	9	<i>pellet</i>	10.50	bc
12	----	----	9.75	c

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.3.3. Peso fresco de follaje de plantas de maíz

El análisis de varianza para el peso fresco de follaje de plantas de maíz (Anexo 13) muestra que la diferencia entre los tratamientos fue altamente significativa ( $P = 0.0001$ ).

El tratamiento testigo, que no incluyó larvas de gallina ciega, registró el mayor peso fresco de follaje (786.3 g) (Cuadro 10). Los tratamientos que incluyeron cuatro larvas de gallina ciega por planta, formulación del nematodo en cadáver y aplicación en V7 y V8 igualaron el peso fresco del testigo mencionado. De manera general, la formulación en cadáver aplicada en V7 y V8, y a un número de larvas de cuatro y ocho, fue el que produjo los mayores valores de peso fresco de follaje. Por otra parte, la formulación en *pellet* aplicada a altas densidades de larvas (ocho y 12), independientemente del momento de aplicación, produjo los menores valores de la variable mencionada.

**Cuadro 10.** Cambios en peso fresco de follaje de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso fresco de follaje (g)
0	----	----	786.3 a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	782.0 a
4	8	cadáver	780.8 a
12	7	cadáver	712.6 b
8	7	cadáver	711.8 b
8	8	cadáver	711.3 b
4	9	cadáver	710.7 b
4	9	<i>pellet</i>	708.7 b
4	7	<i>pellet</i>	707.9 b
4	8	<i>pellet</i>	705.2 b
4	----	----	699.3 b
8	9	cadáver	453.6 c
12	8	cadáver	426.7 cd
8	7	<i>pellet</i>	422.7 d
8	9	<i>pellet</i>	421.5 d
8	8	<i>pellet</i>	420.2 d
8	----	----	416.5 d
12	9	cadáver	412.5 d
12	9	<i>pellet</i>	368.1 e
12	7	<i>pellet</i>	366.7 e
12	8	<i>pellet</i>	366.0 e
12	----	----	350.5 e

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.3.4. Peso seco de follaje de plantas de maíz

El análisis de varianza para el peso seco de follaje de plantas de maíz (Anexo 14) muestra que la diferencia entre los tratamientos fue altamente significativa ( $P = 0.0001$ ).

Los resultados de la comparación de medias se muestran en el Cuadro 11, presentándose una situación similar al de las variables anteriores; es decir, el tratamiento testigo que no incluyó larvas presentó el mayor valor de peso seco de follaje (140.2 g), siendo igualado estadísticamente por la formulación en cadáver, aplicada a plantas con cuatro larvas y en los momentos de control V7 y V8, nuevamente los tratamientos con formulación en cadáver lograron los mayores valores de peso seco de follaje, mientras que la formulación en *pellet* obtuvo los menores.

**Cuadro 11.** Cambios en peso seco de follaje de plantas de maíz, sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso seco de follaje (g)	
0	---	---	140.2	a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	140.0	a
4	8	cadáver	139.5	a
4	---	---	125.8	b
12	7	cadáver	125.7	b
4	8	<i>pellet</i>	124.4	b
4	9	<i>pellet</i>	124.3	b
4	9	cadáver	123.7	b
8	8	cadáver	123.5	b
4	7	<i>pellet</i>	123.3	b
8	7	cadáver	120.8	b
8	9	cadáver	98.7	c
12	8	cadáver	92.8	cd
8	8	<i>pellet</i>	90.9	cd
8	9	<i>pellet</i>	90.6	cd
8	7	<i>pellet</i>	90.5	cd
8	---	---	90.3	cd
12	9	cadáver	85.2	d
12	7	<i>pellet</i>	72.0	e
12	9	<i>pellet</i>	71.5	e
12	8	<i>pellet</i>	69.6	e
12	---	---	66.4	e

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).



#### 5.3.4.1. Análisis del peso seco de follaje por niveles de los factores

Se realizó un análisis de varianza del peso seco de follaje por factores (Anexo 15), para determinar la diferencia entre éstos. A nivel general del modelo, así como por factores individuales y todas las posibles combinaciones entre ellos, hubo alta significancia ( $p = 0.0001$ ).

El resultado de la comparación de medias se presenta en el Cuadro 12. En el caso de número de larvas por planta (cuatro, ocho y 12), el mayor peso de follaje (129.2 g) se obtuvo con la menor densidad de larvas, disminuyendo a medida que la densidad de las larvas aumentó, las tres densidades están ubicadas en categorías estadísticas diferentes, lo cual indica que su efecto en la producción de materia seca es diferente.

En cuanto a momento de aplicación, el mayor peso seco de follaje (112.0 g) se obtuvo a medida que se aplicó más rápidamente el nematodo (*Steinernema glaseri*); es decir, cuando la planta tenía siete hojas (en esta etapa vegetativa las larvas estaban en su segundo estadio), disminuyendo con el retardamiento de la aplicación, lo que hace suponer que a medida que paso mayor tiempo las larvas pasaron a un tercer estadio y se hicieron menos vulnerables al ataque del nematodo. Los tres momentos de aplicación se ubican en categorías estadísticas diferentes, por lo que su efecto en la producción de materia seca es diferente.

En relación con la formulación utilizada para el control de la plaga, la más efectiva fue cadáver logrando el valor más alto de producción de materia seca (116.6 g) comparada con *pellet* (95.2 g); se ubican en categorías estadísticas diferentes, por lo que su efecto en la producción de materia seca es diferente.

**Cuadro 12.** Peso seco de follaje de plantas de maíz por niveles de los factores.

Factor	Peso seco de follaje (g)	
Número de larvas		
4	129.2	a <sup>1</sup>
8	102.5	b
12	86.1	c
Aplicación de los nematodos		
7 hojas	112.0	a
8 hojas	106.8	b
9 hojas	99.0	c
Formulación		
Cadáver	116.6	a
<i>Pellet</i>	95.2	b

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

### 5.3.5. Pesos fresco y seco de raíz, pesos fresco y seco total de la planta

Para no ser repetitivo en cuanto a la descripción del comportamiento de estas cuatro variables, dado que siguen un patrón similar al ya descrito para las variables anteriores, se abordan en conjunto. Los análisis de varianza generales para las cuatro variables y por factores para peso seco de raíz y peso seco total, se presentan en los Anexos 16, 17, 19, 20, 18 y 21 respectivamente, y enseguida se presentan los cuadros que avalan lo descrito en cuanto a la comparación de medias de manera general en las cuatro variables (Anexos 22, 23, 25 y 26) y por factores para peso seco de raíz y peso seco total (Anexos 24 y 27).

Estas cuatro variables siguen el mismo comportamiento de las que ya se han presentado, en el sentido de que el tratamiento testigo que no incluyó larvas fue el que obtuvo los mayores valores de peso; sin embargo, los tratamientos que incluyeron formulación del nematodo en cadáver aplicada a plantas con

cuatro larvas, en etapas vegetativas V7 y V8 lo igualaron estadísticamente; también, de manera general se encontró que las aplicaciones del nematodo en cadáver produjeron pesos mayores comparados con los producidos por la aplicación en *pellet*. A medida que pasó mayor tiempo para aplicar los nematodos; es decir, en etapa vegetativa (V9) y a altas densidades de larvas por planta (ocho y 12), aún la formulación en cadáver ya no logró producir materia seca similar al testigo que no tuvo larvas, por lo que claramente puede establecerse a través de estos resultados, que puede controlarse la plaga de gallina ciega siempre y cuando se tenga una densidad máxima de cuatro larvas por planta, si se aplica el nematodo *Steinernema glaseri* formulado en cadáver en etapa vegetativa V7 o V8.

En cuanto al análisis por factores para peso seco de raíz y peso seco total, hay una clara separación en los tres casos: número de larvas, momento de aplicación del nematodo y formulación, siguiendo el mismo comportamiento que se describió para peso seco de follaje.

### **5.3.6. Análisis de correlación entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca**

Con la información obtenida en el experimento 3, relativa a los porcentajes de pérdida de materia seca de los tratamientos que tuvieron cero, cuatro, ocho y 12 larvas de gallina ciega por planta y que no se les aplicaron nematodos para controlar la larva, se llevó a cabo un análisis de correlación.

Este análisis se realizó con el fin de determinar la correlación existente entre la variable independiente número de larvas de gallina ciega y la variable dependiente porcentaje de pérdida de materia seca, y así, obtener un modelo probabilístico que describiera su comportamiento.

Los resultados de la correlación se presentan en el Anexo 28. El coeficiente de correlación de Pearson es de 0.98864 y presenta un  $p = 0.0114$ , lo cual indica en primer lugar que existe una alta correlación entre estas dos variables (cercana a 1) y en segundo lugar que esta aseveración es válida

estadísticamente, pues presenta un valor menor a 0.05. Con fundamento en esta alta correlación se justificó generar un modelo para describir el comportamiento de estas dos variables.

### **5.3.7. Análisis de regresión lineal entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca.**

Los resultados del análisis de regresión lineal entre las variables mencionadas se muestran en el Anexo 29. Por otra parte, el valor de  $r^2 = 0.9774$ , lo que indica que, en el modelo, la variación de los valores de la variable dependiente son explicados en un 97.74% por la variación de los valores de la variable independiente.

De acuerdo con los parámetros estimados en este análisis se generó el siguiente modelo lineal:

$$\% \text{ de pérdida de materia seca} = 4.552817 (\text{Número de larvas}) - 2.785165$$

Donde , 4.552817: constante del modelo, que  
corresponde a la pendiente  
de la recta.

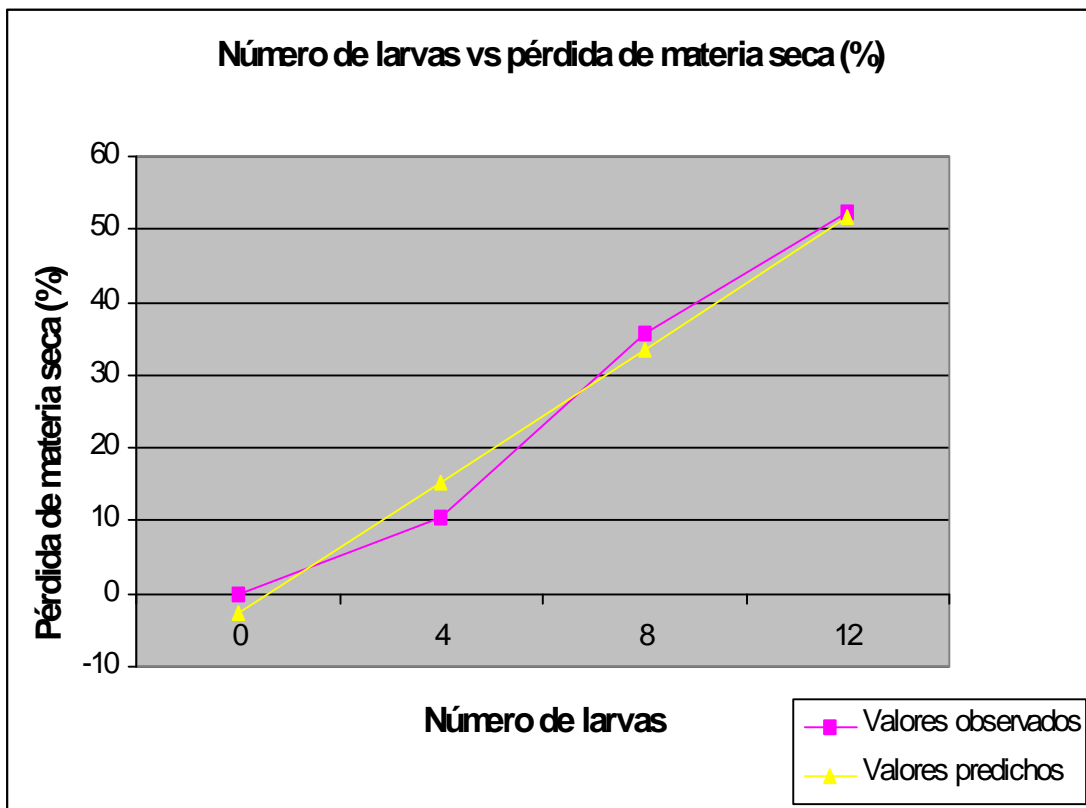
-2.785165: constante del modelo que  
corresponde al intercepto  
con el eje y.

En el contexto del trabajo realizado, la constante 4.552817 que corresponde a la pendiente de la recta significa el porcentaje de pérdida de materia seca que causa la presencia de una sola larva.

Por otra parte la constante -2.785165 sólo tiene significado como un factor de ajuste, de acuerdo con Herrera y Lorenzana (1995), quienes mencionan que el valor de la ordenada muchas veces sólo tiene significado como un factor de ajuste, sin ninguna interpretación biológica, como en este caso en que no es

posible biológicamente que exista un porcentaje de disminución de materia seca negativo, cuando el número de larvas es cero.

En la Figura 12 se grafica la recta que describe el modelo lineal generado, la cual está definida por los valores predichos calculados con dicho modelo, se grafican además los valores observados en el experimento. Con apoyo de este modelo se calculó posteriormente el umbral económico de daño.



**Figura 12.** Valores observados y predichos de la relación entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca

### 5.3.8. Cálculo del umbral económico (UE)

De acuerdo con información proporcionada por el Centro Regional Sur de la Universidad Autónoma Chapingo, se tienen los siguientes datos de producción de forraje (materia seca del follaje) y producción de maíz grano, para parcelas de temporal sembradas con maíz criollo “bolita” en los Valles Centrales de Oaxaca:

Distancia entre surcos 0.60 m	166.7 surcos /ha
Distancia entre matas 1.0 m	100 matas /surco
Por lo tanto	16,670 matas /ha
	* 2 plantas /mata
	33,340 plantas/ha
	* 140.2 g/planta seca
	4,674.3 k g/ha de forraje seco

Cada paca de forraje seco pesó 20 kg y se vendió a \$20.00 pesos

Por lo tanto el precio unitario del forraje seco fue de \$ 1.00 /kg

Producción promedio de maíz grano criollo “bolita” sembrado en parcelas de temporal en los Valles Centrales de Oaxaca 1,500 kg /ha.

El precio unitario de venta del maíz fue de \$ 3.50 /kg

Por otra parte, en el cuadro 13 se muestran los costos de producción de nematodos y su aplicación en campo definidos en el Laboratorio de Control Biológico del CIIDIR.

**Cuadro 13.** Costo de producción de nematodos entomopatógenos en laboratorio y aplicación en campo.

Concepto	Cantidad	Precio unitario (\$)	Costo total (\$/ha)
Medio de cultivo para <i>G. mellonella</i>	415 g de dieta (salvado, miel, cereal, glicerina, levadura)	43.00	43.00
Energía eléctrica	192 h	0.04	7.68
Agua destilada	5 L	2.00	10.00
Papel filtro	60	1.50	90.00
Mano de obra	6 h	33.33	200.00
Mano de obra para aplicación	1 día	150.00	150.00
Agua para aplicación	200 L	0.20	40.00
<b>Costo total /ha</b>			<b>540.68</b>

### 5.3.8.1 Umbral económico para producción de forraje seco

Umbral de Ganancia (UG).- Reducción en el rendimiento, necesario para pagar el costo de control.

Si el costo de control de la plaga de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) aplicando nematodos es de \$ 540.68 /ha y el producto vale \$ 1.00 /kg, el Umbral de Ganancia es:

$$\text{\$ } 540.68 \text{ /ha} \div \text{\$ } 1.00 \text{ /kg} = 540.68 \text{ kg /ha}$$

Por lo tanto UG = 540.68 kg /ha

Nivel de Daño Económico (NDE).- Es el número mínimo de insectos o esporas que pueden causar un daño económico (daño que justifica control).

Si se sabe (de acuerdo con el modelo lineal generado previamente) que una larva de *Ph. vetula* por planta causa una pérdida de materia seca de 4.6%, lo que implica una disminución de 215.0 kg de materia seca /ha, ¿Cuál es el NDE con un umbral de ganancia de 540.68 kg /ha?

$$\begin{array}{l} 1 \text{ larva /planta} \text{ ----- } 215.0 \text{ kg /ha} \\ \text{NDE} \text{ ----- } 540.68 \text{ kg /ha} \end{array}$$

$$\text{NDE} = (540.68 \text{ kg /ha}) (1 \text{ larva /planta}) \div 204.2 \text{ kg /ha} = 2.5 \text{ larvas /planta}$$

Por lo tanto NDE = 2.5 larvas /planta

Umbral Económico (UE).- Nivel de infestación al cual se debe implementar el control a fin de evitar llegar al NDE. Normalmente el UE puede considerarse como un 70% del NDE.

$$\text{UE} = (0.7) (\text{NDE}) = (0.7) (2.5 \text{ larvas /planta}) = 1.8 \text{ larvas /planta}$$

Por lo tanto **UE = 1.8 larvas /planta**

Esto quiere decir que si lo que interesa principalmente es la producción de forraje seco, se debe realizar el control de la plaga de gallina ciega (*Ph. Vetula*) cuando se tengan en promedio 1.8 larvas de segundo estadio por planta de maíz en etapa vegetativa de siete hojas (V7).

### **5.3.8.2 Umbral económico para producción de maíz grano**

Umbral de Ganancia (UG)

Si el costo de control de la plaga de gallina ciega (*Ph. vetula*) aplicando nematodos es de \$ 540.68 /ha y el producto vale \$ 3.50 /kg, el Umbral de Ganancia es:

$$\$ 540.68 /ha \div \$ 3.50 /kg = 154.5 \text{ kg /ha}$$



Por lo tanto UG = 154.5 kg /ha

#### Nivel de Daño Económico (NDE)

Se sabe (de acuerdo con el modelo lineal generado previamente) que una larva de *Ph. vetula* por planta causa una pérdida de materia seca de 4.6%, lo que implica una disminución de 215.0 kg de materia seca /ha, también sabemos que una planta de maíz seca pesa en promedio 140.2 g, por lo tanto, esta disminución en materia seca equivale a una disminución de 1533.5 plantas. El rendimiento promedio de maíz grano es de 1,500 kg /ha y la densidad de plantas por hectárea es de 33,340; por lo tanto cada planta produce 45.0 g de maíz, en consecuencia, las 1,533.5 plantas que disminuyen por efecto de la presencia de una larva por planta equivalen a una disminución en el rendimiento de maíz grano de 69.0 kg /ha.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ larva /planta} \text{ ----- } 69.0 \text{ kg /ha} \\ \text{NDE} \text{ ----- } 154.5 \text{ kg /ha} \end{array}$$

$$\text{NDE} = (154.5 \text{ kg /ha}) (1 \text{ larva /planta}) \div 69.0 \text{ kg /ha} = 2.2 \text{ larvas /planta}$$

Por lo tanto NDE = 2.2 larvas /planta

#### Umbral Económico (UE)

$$\text{UE} = (0.7) (\text{NDE}) = (0.7) (2.2 \text{ larvas /planta}) = 1.5 \text{ larvas /planta}$$

Por lo tanto **UE = 1.5 larvas /planta**

Esto quiere decir que si lo que interesa principalmente es la producción de maíz grano, se debe realizar el control de la plaga de gallina ciega (*Ph. Vetula*) cuando se tengan en promedio 1.5 larvas de segundo estadio por planta de maíz en etapa vegetativa de siete hojas (V7).

Es claro que la producción de maíz grano es más sensible al ataque de *Ph. vetula*, por lo que su umbral económico es menor; es decir, se debe iniciar el control de la plaga antes, comparado con la producción de forraje seco.

Los resultados de este estudio concuerdan con Ruiz *et al.* (2006) quienes reportan que, utilizando el hongo *Metarhizium anisoplae* formulado en aceite, para controlar la plaga de gallina ciega (*Ph. vetula*), debe aplicarse el control cuando se tenga una larva de segundo estadio por planta de maíz en etapa vegetativa temprana (V3), en el caso estudiado en el presente trabajo los umbrales son mayores puesto que la etapa vegetativa V7 es posterior a V3, y por lo tanto las plantas resisten un mayor ataque de larvas pues poseen mayor volumen de raíces.

Contrastando los umbrales económicos de daño para la producción de forraje y para la producción de grano que corresponden a 1.8 y 1.5 larvas de gallina ciega de segundo estadio por planta en etapa vegetativa V7, respectivamente, con los resultados del experimento 3, en donde se estableció que la plaga puede controlarse de manera eficiente aún cuando se tengan cuatro larvas de segundo estadio por planta, si se aplica como control el nematodo entomopatógeno *S. glaseri* formulado en cadáver de larva de *G. mellonella*, en la etapa V7 o V8, puede inferirse que se logrará un buen control bajo estas condiciones.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Experimento 1

El tratamiento que causó mayor mortalidad de larvas (97.5%) de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) fue *Steinernema glaseri* aplicado en suspensión acuosa a una dosis de 1,000 nematodos por larva.

Los tratamientos que incluyeron *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae* aplicados en medio acuoso y a una dosis de 1,000 nematodos por larva causaron mortalidades de 87.5% y 60.0%, respectivamente.

Los tres resultados descritos se ubican en categorías estadísticas diferentes, por lo que el efecto de estas tres especies en el control de gallina ciega (*Ph. vetula*) fue diferente.

El efecto de los tres nematodos (*S. glaseri*, *S. feltiae* y *H. bacteriophora*) aplicados en medio acuoso, en dosis de 500 nematodos por larva fue similar estadísticamente, con mortalidades de 50.0%, 47.5% y 35.0%, respectivamente.

En dosis de 200, 100 y 50 nematodos por larva la mortalidad producida por las tres especies de nematodos se agrupan estadísticamente en el mismo grupo que el testigo al que no se le aplicaron nematodos para controlar la larva, lo cual quiere decir que a estas dosis no hubo efecto en el control de la plaga.

Las concentraciones letales (nematodos / larva) para eliminar el 50% y 95% de larvas de *Ph. vetula*, fueron para *S. glaseri* de 548 y 1,035; para *H. bacteriophora* de 678 y 1,353 y para *S. feltiae* de 841 y 1,591, respectivamente.

Los tiempos letales (días) para eliminar el 50% y 95% de larvas de *Ph. vetula*, fueron para *S. glaseri* de uno y 16; para *H. bacteriophora* de uno y 34 y para *S. feltiae* de siete y 105, respectivamente.

Es claro que *S. glaseri* fue quién presentó las mejores características para controlar la plaga de gallina ciega (*Ph. vetula*) bajo las condiciones de este experimento.

## **Experimento 2**

El tratamiento que causó mayor mortalidad de larvas de gallina ciega (75.0%) fue el que incluyó al nematodo *S. glaseri*, aplicado en medio acuoso y en condiciones de humedad moderada en el suelo (-0.6 Mpa). En segundo lugar con un 55.0% de mortalidad se encuentra el mismo nematodo formulado en cadáver, también bajo condiciones de humedad moderada en el suelo y en tercer lugar con un 30.05% de mortalidad el mismo nematodo aplicado en medio acuoso y en condiciones de humedad alta en el suelo (-0.08 Mpa).

Por lo tanto, *S. glaseri* fue quién presentó los mejores resultados en el control de *Ph. vetula*; mientras que *S. feltiae* y *H. bacteriophora* no fueron eficientes en el control, presentando mortalidades estadísticamente similares al testigo al que no se le aplicaron nematodos para el control de la larva.

La humedad de suelo moderada (-0.6 Mpa) fue la más adecuada para el control de *Ph. vetula* con mortalidades de 75.0% y 55.0%.

Las aplicaciones del nematodo más eficientes para el control de *Ph. vetula* fueron medio acuoso y cadáver con 75.0% y 55.0% de mortalidad respectivamente; *pellets* por su parte, no funcionó presentando mortalidades estadísticamente similares al testigo al que no se le aplicaron nematodos para el control de la larva.

La recomendación para el control de *Ph. vetula* que surge de estos resultados es: aplicar el nematodo *S. glaseri* en medio acuoso o formulado en cadáver

infectado de *G. mellonella* en condiciones de humedad moderada del suelo (-0.60 MPa); el siguiente paso es validarlo en campo.

### **Experimento 3**

El nematodo *S. glaseri* formulado en cadáver, aplicado a plantas de maíz que tenían una densidad de cuatro larvas de gallina ciega (*Ph. vetula*) por planta y en etapa vegetativa V7 y V8, igualó estadísticamente al testigo (el cual no incluyó presencia de larvas) en cuanto a altura de plantas, número de hojas, pesos húmedo y seco de follaje, pesos húmedo y seco de raíz y pesos húmedo y seco total de la planta.

Los resultados de aplicar el nematodo *S. glaseri* formulado en *pellets* resultaron similares estadísticamente al testigo que incluyó larvas de *Ph. vetula*, pero no se le aplicaron nematodos para controlarlos; es decir, no hubo efecto en el control.

Por lo tanto, aplicando el nematodo *S. glaseri* formulado en cadáver puede controlarse la plaga, aún cuando se tengan cuatro larvas por planta, si se realiza en la etapa V7 y V8, en la V9 ya no se garantizan buenos resultados.

Considerando la producción de forraje, el umbral económico de daño para la plaga de gallina ciega (*Ph. vetula*) en plantas de maíz en etapa vegetativa V7 es de 1.8 larvas de segundo estadio por planta.

Considerando la producción de maíz grano, el umbral económico de daño para la plaga de gallina ciega (*Ph. vetula*) en plantas de maíz en etapa vegetativa V7 es de 1.5 larvas de segundo estadio por planta.

De acuerdo con los umbrales económicos de daño para la producción de forraje y maíz grano, es posible controlar la plaga aplicando el nematodo *S. glaseri* en la etapa V7 o V8 formulado en cadáver de larva de *G. mellonella*,

pues esta recomendación logra un control eficiente, aún cuando se tengan cuatro larvas de segundo estadio por planta, si se aplica en V7 o V8.

## CAPÍTULO VII

### LITERATURA CITADA

- Aguirre Uribe, L. A. y C. Salazar Silva. 1999. Prólogo, pp. 9-10. *In: Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de plagas.* H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically-associated with insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.*, 121: 303-309.
- Alatorre Rosas, R. y A. Guzmán Franco. 1999. Nematodos parásitos de insectos, pp. 13, 21, 22. *In: Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas.* H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Alatorre Rosas, R. 1999. Perspectiva del uso de nematodos entomopatógenos en México, pp. 72, 73, 77. *In: Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas.* H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Badilla, F. y M. Chacón. 1994. Manejo integrado de jobotos *Phyllophaga* spp. en cultivo de caña de azúcar en Costa Rica. CATIE. Costa Rica.
- Bonifasi, E. y J. Neves. 1990. La production de masse des nématodes entomopathogènes: Steinernematidae et Heterorhabditidae. *In: Rencontres Caraïbes en Lutte Biologique, Guadeloupe, 5-7 novembre 1990.* De. INRA, París 1991. Les Colloques, 58: 125-132.

- Burges, H. D. 1998. Formulation of mycoinsecticides, pp. 131 -186. *In: Formulation of Microbial Pesticides*. Burges, H. D. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Cabanillas, H. E. 1999. The entomopathogenic nematode *Steinernema riobravis* and its potential as biocontrol agent, p. 51. *In: Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas*. H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Creighton, C. S. and G. Fassuliotis. 1985. *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): A nematode parasite isolated from the banded cucumber beetle *Diabrotica balteata*. *J. Nematol.*, 17: 150-153.
- Cui, L.; R. Gaugler and Y. Wang. 1993. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabeidae). *J. Invertebr. Pathol*, 62: 73 -78.
- Dirt Works. 2001. Available in: <http://www.dirtworks.net/Images/NCO/nematode/Nematodecycle.jpg> . Accessed: February 2007.
- Entomology, University of Nebraska – Lincoln. 2000. Available in: <http://entomology.unl.edu/turfent/documnts/mchafers.htm> . Accessed: February 2007.
- Gaugler, R., T. McGuire and J. Campbell. 1989. Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematodes. *Oecology*, 109: 483 -489.
- Gaugler, R. 1999. Ecological Considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 24: 351 -360.



- Georgis, R. 1990. Formulation and application technology, pp.173 -194. *In*: "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control". R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U. S. A..
- Georgis, R. 1991. Present and future prospect for entomopathogenic nematode products. *Biocontr. Sci. Technol.*, 2: 83-99.
- González M., A. 1989. Investigaciones realizadas sobre *Phyllophaga* spp. atacando cafeto en El Salvador, p. 20. *In*: Taller Regional Integrado de Plagas Insectiles de Suelo con énfasis en *Phyllophaga* spp. CENTA-CATIE. El Salvador.
- Grewal, P. and R. Georgis. 1998. Entomopathogenic nematodes, pp. 271-299. *In*: "Methods in Biotechnology" Vol. 5, "Biopesticides: Use and Delivery". F. R. Hall and J. J. Menn (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, U. S. A.
- Grewal, P. S., R. Gaugler and J. F. Campbell. (1994). Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108: 207-215.
- Hamblin, A. P. 1981. Filter- paper method for routine measurement of field water potential. *J. Hydrol.*, 53: 355 – 360.
- Herrera Haro, J. G. y G. Lorenzana-Cárdenas. 1995. Aplicaciones del SAS (Statistical Analysis System) a los métodos estadísticos. Apoyos Didácticos No. 3. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca, Centro de Investigaciones y Graduados Agropecuarios, p. 67.
- Hidalgo, H. 2001. Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. Hoja Técnica No. 37. Revista Manejo Integrado de Plagas. CATIE. No. 60, junio 2001.
- Hominick, W. M., B. R. Briscoe, F. G. Del Pino, J. Heng, D. J. Hunt, E. Kozodoy, Z. Mracek, K. B. Nguyen, A. P. Reid, S. Spirinodov, P. Stock, D. Sturhay, C.

- Waturu and M. Yoshida. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.*, 71: 271 - 298.
- Ibarra, J. E. 1998. Comunicación personal. CINVESTAV, Irapuato, Gto.
- INEGI. 2001. Anuario Estadístico de Oaxaca, tomo I y II, México, D. F.
- Jackson, T. A. 2003. Using entomopathogens in scarab pest management, pp. 333-334. *In: Estudios Sobre Coleópteros del suelo en América*. Aragón, G. A., M. A. Morón y A. Marín J. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue., México.
- Kaya, H. K. and A. Koppenhöfer. 1999. Enhancing the efficacy of entomopathogenic nematodes with other control agents, p. 27. *In: Potencial de Nemátodos Entomopatógenos en el Control de Plagas*. H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 181-206.
- Klein, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests, pp 195-214. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control*. R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U. S. A.
- Koppenhofer, A. M. 2000. Nematodes, pp. 283-301. *In: "Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology"*. L. A. Lacey and H. K. Kaya (Eds.). Kluwer Academic, Dordrecht.
- Larriva, W. I. 2002. Nematodos que se alimentan de insectos: Una opción para el Manejo Integrado de Plagas. *Revista de la Universidad del Azuay*, 29: 83 -91.

- Lewis, E. E., R. Gaugler and R. Harrison. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105: 103-107.
- Marh, S. 2001. The nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. University of Wisconsin, Madison, U. S. A.
- Melo, E. L., C. A. Ortega Ojeda, A. Gaigl y A. C. Bellotti. 2005. Efecto del estado de desarrollo de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae) con dos cepas de entomonematodos. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Cali, Colombia.
- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Ed. CECOSA. México, D. F., pp. 92 -98.
- Morón, M. A. 1983. Introducción a la biosistemática y ecología de los Melolonthida e edafícola de México. II Mesa redonda sobre plagas del suelo, Chapingo, Méx.
- Morón, M. A. 1986. Revisión del género *Phyllophaga* Harris en México. (Insecta Coleóptera Melolonthidae). *Instituto de Ecología*, 20: 1 -375. Jalapa, Ver.
- Poinar, G. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp. 33-61. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control*. R. Gaugler and H. Kaya (Eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U. S. A.
- Poinar, G. O. Jr. 1975. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.
- Romero, P. S. 1980. Plagas del maíz en México, pp. 21 -28. Memoria VIII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola, México, D. F.

- Ruiz V., J., F. Arce, J. García y H. K. Kaya. 1998. Colecta de nematodos entomopatógenos para el control de larvas de escarabeidos en Oaxaca, pp. 254-256. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Entomología, Acapulco, México.
- Ruiz V., J., S. Girón-Pablo y T. Aquino. 2006. Umbrales económicos para el uso de entomopatógenos en el control de "gallinas ciegas" (*Phyllophaga vetula* Horn), p. 273. *In: Diversidad, importancia y manejo de escarabajos edafícolas.* Castro-Ramírez, A. E., M. A. Morón y A. Aragón (Eds). Publicación especial del Colegio de la Frontera sur, la Fundación PRODUCE Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Ruiz V., J., T. Aquino and H. K. Kaya. 2000. Controlling white grubs (*Phyllophaga* spp.) with entomopathogenic nematodes and fungi in Oaxaca, México, p. 84. Abstracts del XXXIII Congreso de la Society for Invertebrate Pathology, agosto 13-18 del 2000. Guanajuato, Gto., México.
- SARH, 1988. Principales plagas del maíz. Dirección General de Sanidad. Talleres Gráficos de la Nación. México, D. F., pp. 29-32.
- Saunders, J. L. 1998. Las plagas invertebradas de cultivos alimenticios anuales en América Central. CETIE. Turrialba, p. 306.
- Shapiro, D. I., and I. Glazer. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected host versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 25: 1455-1461.
- Simoës, N., and J. S. Rosa. 1996. Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontr. Sci. Technol.*, 6: 403-411.
- Sirjusingh, C., H. Mauleon and A. Kermarrec. 1990. Compatibility and synergism between entomopathogenic nematodes and pesticides for control of *Cosmopolites sordidus* Germar. *Florida Entomologist*, 73(1): 183-192.

- Smart, G. C., Jr. and K. B. Nguyen. 1994. Role of entomopathogenic nematodes in biological control, pp. 231-252. *In*: Pest management in the subtropics: Biological control a Florida perspectiva. D. Rosen, F. D. Bennett y J. L. Capinera (Eds). UK, Andover Intercept.
- Strauch, O., J. Oestergaard, S. Hollmer and R. -U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biol. Control*, 31: 219.
- Tanada, P. and H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego California, U. S. A., pp. 206-210
- Villalobos, J. F. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pests of corn in Mexico, pp. 253-260. *In*: Use of pathogens in scarab pest management. T. A. Jackson y T. R. Glare (Eds.). Intercept Ltd., Andover, Hampshire.
- Wilson, G. 1969. White grubs as pest of sugar cane. *Elsevier*, 31: 237-258.

## ANEXOS

### EXPERIMENTO 1

**Anexo 1.** Análisis de varianza del experimento 1.

Fuente de variación (F. V.)	Grados de libertad (G. L.)	Sumas de cuadrados (S. C.)	Cuadrados medios (C. M.)	Valor F	Prob > F
Modelo	18	10.9840	0.6102	46.03	0.0001
Error	45	0.5966	0.0133		
Total	63	11.5806			

$r^2 = 0.9485$       C. V. = 33.97

Fuente de variación (F. V.)	Grados de libertad (G. L.)	Sumas de cuadrados (S. C.)	Cuadrados medios (C. M.)	Valor F	Prob > F
Tratamiento	15	10.9348	0.7290	54.99	0.0001
Repetición	3	0.0492	0.0164	1.24	0.3071

**Anexo 2.** Análisis de varianza del experimento 1 por factores.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Valor F	Prob > F
Modelo	14	10.5143	0.7510	52.95	0.0001
Error	45	0.6383	0.0142		
Total	59	11.1526			

$r^2 = 0.9428$       C. V. = 33.09

F. V.	G. L.	S. C. Tipo I	C. M.	Valor F.	Prob > F
Nematodo	2	0.4836	0.2418	17.05	0.0001
Dosis	4	9.0805	2.2701	160.04	0.0001
Nematodo x dosis	8	0.9501	0.1188	8.37	0.0001

F .V.	G. L.	S. C. Tipo III	C. M.	Valor F	Prob > F
Nematodo	2	0.4836	0.2418	17.05	0.0001
Dosis	4	9.0805	2.2701	160.04	0.0001
Nematodo x dosis	8	0.9502	0.1188	8.37	0.0001

**Anexo 3.** Dosis letales generadas por el análisis Probit para *Steinernema glaseri*.

% de mortalidad	Dosis	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	- 140.03	-293.09	-33.94
2	-59.39	-193.70	35.61
3	-8.22	-131.14	80.23
4	30.27	-84.40	114.12
5	61.58	-46.64	141.95
6	88.22	-14.71	165.84
7	111.59	13.11	186.97
8	132.51	37.85	206.05
9	151.54	60.21	223.55
10	169.05	80.66	239.79
15	241.57	163.72	308.63
20	299.20	227.52	365.56
25	348.64	280.43	416.22
30	393.04	326.43	463.23
35	434.19	367.81	508.04
40	473.23	406.03	551.60
45	511.00	442.16	594.61
50	548.18	476.99	637.65
55	585.35	511.20	681.31
60	623.13	545.45	726.19

65	662.17	580.38	773.05
70	703.32	616.76	822.85
75	747.72	655.63	876.99
80	797.16	698.53	937.67
85	854.79	748.12	1008.81
90	927.31	810.03	1098.80
91	944.82	824.92	1120.60
92	963.85	841.07	1144.31
93	984.77	858.80	1170.40
94	1008.14	878.57	1199.58
95	1034.78	901.08	1232.89
96	1066.09	927.49	1272.07
97	1104.58	959.89	1320.30
98	1155.75	1002.87	1384.50
99	1236.39	1070.45	1485.85

**Anexo 4.** Tiempos letales generados por el análisis Probit para *Steinernema glaseri*.

% de mortalidad	Días	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	-37.171	-74.926	-22.389
2	-33.516	-68.403	-19.833
3	-31.197	-64.266	-18.210
4	-29.452	-61.155	-16.987
5	-28.033	-58.625	-15.992
6	-26.825	-56.472	-15.144
7	-25.766	-54.585	-14.400
8	-24.818	-52.896	-13.734
9	-23.955	-51.361	-13.127
10	-23.161	-49.947	-12.569
15	-19.875	-44.100	-10.252



20	-17.262	-39.459	-8.404
25	-15.021	-35.483	-6.813
30	-13.009	-31.918	-5.379
35	-11.144	-28.621	-4.044
40	-9.374	-25.498	-2.771
45	-7.662	-22.485	-1.531
50	-5.977	-19.530	-0.301
55	-4.292	-16.587	0.941
60	-2.580	-13.613	2.220
65	-0.811	-10.564	3.566
70	1.054	-7.388	5.023
75	3.067	-4.025	6.660
80	5.308	-0.406	8.607
85	7.920	3.533	11.156
90	11.207	7.810	15.043
91	12.001	8.711	16.114
92	12.863	9.636	17.332
93	13.811	10.595	18.729
94	14.870	11.605	20.349
95	16.078	12.695	22.260
96	17.497	13.910	24.570
97	19.242	15.334	27.479
98	21.561	17.148	31.425
99	25.216	19.898	37.755

**Anexo 5.** Dosis letales generadas por el análisis Probit para *Heterorhabditis bacteriophora*.

% de mortalidad	Dosis	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	-277.64	-509.61	-125.42
2	-165.70	-367.15	-31.17

3	-94.67	-277.37	29.22
4	-41.24	-210.24	75.07
5	2.22	-155.97	112.69
6	39.22	-110.05	144.98
7	71.65	-70.03	173.54
8	100.70	-34.42	199.34
9	127.11	-2.24	223.01
10	151.42	27.18	245.00
15	252.08	146.54	338.47
20	332.09	237.77	416.39
25	400.72	312.84	486.45
30	462.36	377.49	552.12
35	519.48	435.10	615.28
40	573.68	487.89	677.08
45	626.11	537.47	738.37
50	677.72	585.05	799.90
55	729.32	631.66	862.41
60	781.76	678.20	926.73
65	835.96	725.63	993.90
70	893.07	775.01	1065.28
75	954.71	827.76	1142.86
80	1023.35	885.98	1229.76
85	1103.35	953.31	1331.58
90	1204.01	1037.42	1460.30
91	1228.33	1057.66	1491.47
92	1254.74	1079.62	1525.36
93	1283.78	1103.72	1562.66
94	1316.22	1130.61	1604.35
95	1353.21	1161.23	1651.95
96	1396.67	1197.16	1707.92
97	1450.10	1241.25	1776.80
98	1521.13	1299.76	1868.47
99	1633.08	1391.78	2013.15

---

**Anexo 6.** Tiempos letales generados por el análisis Probit para *Heterorhabditis bacteriophora*.

% de mortalidad	Días	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	-48.937	-74.148	-34.826
2	-43.277	-66.251	-30.404
3	-39.685	-61.242	-27.596
4	-36.983	-57.476	-25.483
5	-34.786	-54.413	-23.764
6	-32.915	-51.806	-22.300
7	-31.275	-49.521	-21.015
8	-29.806	-47.476	-19.865
9	-28.471	-45.616	-18.818
10	-27.241	-43.904	-17.854
15	-22.151	-36.823	-13.859
20	-18.106	-31.202	-10.676
25	-14.635	-26.387	-7.938
30	-11.518	-22.070	-5.472
35	-8.630	-18.079	-3.177
40	-5.890	-14.304	-0.989
45	-3.238	-10.666	1.143
50	-0.629	-7.105	3.261
55	1.981	-3.574	5.409
60	4.632	-0.033	7.638
65	7.373	3.546	10.023
70	10.261	7.172	12.682
75	13.377	10.816	15.820
80	16.848	14.455	19.735
85	20.893	18.224	24.770
90	25.983	22.576	31.494
91	27.213	23.594	33.152
92	28.548	24.690	34.963

93	30.017	25.886	36.963
94	31.657	27.213	39.205
95	33.528	28.717	41.772
96	35.725	30.475	44.797
97	38.427	32.625	48.526
98	42.019	35.470	53.497
99	47.679	39.934	61.352

**Anexo 7.** Dosis letales generadas por el análisis Probit para *Steinernema feltiae*.

% de mortalidad	Dosis	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	-218.72	-490.35	-48.82
2	-94.50	-327.09	54.41
3	-15.69	-224.42	120.81
4	43.59	-147.83	171.40
5	91.82	-86.04	213.07
6	132.86	-33.90	248.98
7	168.85	11.42	280.88
8	201.08	51.62	309.80
9	230.38	87.85	336.45
10	257.36	120.87	361.30
15	369.05	253.54	468.24
20	457.82	353.23	558.99
25	533.98	434.08	641.51
30	602.37	503.07	719.24
35	665.74	564.29	793.99
40	725.88	620.35	866.93
45	784.06	673.08	939.03
50	841.32	723.81	1011.14
55	898.58	773.62	1084.16
60	956.76	823.50	1159.10

65	1016.89	874.44	1237.17
70	1080.27	927.58	1319.99
75	1148.66	984.43	1409.85
80	1224.81	1047.27	1510.39
85	1313.58	1120.04	1628.06
90	1425.27	1211.05	1776.67
91	1452.25	1232.95	1812.64
92	1481.56	1256.72	1851.74
93	1513.78	1282.83	1894.76
94	1549.77	1311.95	1942.85
95	1590.82	1345.13	1997.73
96	1639.04	1384.05	2062.27
97	1698.33	1431.83	2141.67
98	1777.14	1495.25	2247.32
99	1901.35	1595.02	2414.03

**Anexo 8.** Tiempos letales generados por el análisis Probit para *Steinernema feltiae*.

% de mortalidad	Días	Intervalo	
		Límite inferior	Límite superior
1	-130.159	-460.336	-70.186
2	-114.029	-407.785	-60.638
3	-103.795	-374.446	-54.577
4	-96.097	-349.368	-50.016
5	-89.835	-328.971	-46.304
6	-84.505	-311.611	-43.143
7	-79.831	-296.391	-40.370
8	-75.647	-282.764	-37.886
9	-71.841	-270.373	-35.627
10	-68.338	-258.967	-33.546
15	-53.834	-211.757	-24.916

20	-42.307	-174.258	-18.036
25	-32.418	-142.115	-12.105
30	-23.537	-113.288	-6.742
35	-15.308	-86.633	-1.713
40	-7.499	-61.446	3.164
45	0.057	-37.307	8.112
50	7.492	-14.237	13.668
55	14.927	5.632	22.425
60	22.483	16.490	40.656
65	30.292	22.684	64.525
70	38.521	28.140	90.752
75	47.402	33.694	119.390
80	57.291	39.726	151.431
85	68.818	46.667	188.869
90	83.322	55.337	236.038
91	86.825	57.425	247.437
92	90.631	59.691	259.823
93	94.815	62.181	273.443
94	99.489	64.959	288.658
95	104.819	68.125	306.012
96	111.081	71.843	326.404
97	118.779	76.410	351.476
98	129.013	82.476	384.809
99	145.143	92.031	437.354

## EXPERIMENTO 2

### Anexo 9. Análisis de varianza del experimento 2.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	22	3.4798	0.1582	19.38	0.0001
Error	57	0.4652	0.0082		
Total	79	3.9451			

$r^2 = 0.8820$       C. V. = 56.18

F. V.	G. L.	S. C. Tipo I	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	19	3.4174	0.1799	22.04	0.0001
Repetición	3	0.0625	0.0208	2.55	0.0646

F. V.	G. L.	S. C. Tipo III	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	19	3.4174	0.1799	22.04	0.0001
Repetición	3	0.0625	0.0208	2.55	0.0646

**Anexo 10.** Análisis de varianza del experimento 2 por factores.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	17	3.4014	0.2001	23.70	0.0001
Error	54	0.4559	0.0084		
Total	71	3.8573			
$r^2 = 0.8818$		C. V. = 55.7978			

F. V.	G. L.	S. C. Tipo III	C. M.	F	Prob > F
Nematodo	2	1.3232	0.6616	78.36	0.0001
Formulación	2	0.4509	0.2254	26.70	0.0001
Humedad	1	0.0528	0.0528	6.25	0.0155
Nematodo x formulación	4	0.5497	0.1374	16.28	0.0001
Nematodo x humedad	2	0.6527	0.3264	38.66	0.0001
Formulación x humedad	2	0.0970	0.0485	5.74	0.0055
Nem x form x hum	4	0.2751	0.0688	8.15	0.0001

### EXPERIMENTO 3

**Anexo 11.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta altura de plantas al momento de finalizar el experimento.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	149781.3181	6240.8883	105.09	0.0001
Error	63	3741.1818	59.3838		
Total	87	153522.5000			
$r^2 = 0.9756$		C. V. = 4.1044			

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	149684.0000	7127.8095	120.03	0.0001
Repetición	3	97.3182	32.4394	0.55	0.6525

**Anexo 12.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta número de hojas al momento de finalizar el experimento.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	132.4091	5.5170	27.63	0.0001
Error	63	12.5795	0.1997		
Total	87	144.9886			
$r^2 = 0.9132$		C. V. = 3.4403			

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	131.7386	6.2733	31.42	0.0001
Repetición	3	0.6705	0.2235	1.12	0.3481



**Anexo 13.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso húmedo de follaje.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	2439857.6763	101660.7365	786.13	0.0001
Error	63	8147.0492	129.3182		
Total	87	2448004.7256			
$r^2 = 0.9967$		C. V. = 2.0108			

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	2439526.5099	116167.9290	898.31	0.0001
Repetición	3	331.1665	110.3888	0.85	0.4699

**Anexo 14.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso seco de follaje.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	51583.8855	2149.3286	96.76	0.0001
Error	63	1399.3735	22.2123		
Total	87	52983.2590			
$r^2 = 0.9736$		C. V. = 4.4492			

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	51548.2115	2454.6767	110.51	0.0001
Repetición	3	35.6740	11.8913	0.54	0.6598

**Anexo 15.** Análisis de varianza del experimento 3 por factores considerando como variable respuesta peso seco de follaje.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	17	38043.3257	2237.8427	104.18	0.0001
Error	54	1159.9075	21.4798		
Total	71	39203.2332			
<hr/>					
$r^2 = 0.9704$	C. V. = 4.3729				

F. V.	G. L.	S. C. Tipo	C. M.	F	Prob > F
III					
Larvas	2	22678.1119	11339.0560	527.89	0.0001
Control	2	2066.1536	1033.0768	48.10	0.0001
Form	1	8258.2668	8258.2668	384.47	0.0001
Larv x Cont	4	983.0114	245.7528	11.44	0.0001
Larv x Form	2	1217.2769	608.6385	28.34	0.0001
Cont x Form	2	2150.2036	1075.1018	50.05	0.0001
Larv x Cont x Form	4	690.3014	172.5753	8.03	0.0001

**Anexo 16.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso húmedo de raíz.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	19431.6718	809.6530	54.04	0.0001
Error	63	943.8926	14.9824		
Total	87	20375.5644			
<hr/>					
$r^2 = 0.9537$	C. V. = 9.8786				

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	19390.4969	923.3570	61.63	0.0001
Repetición	3	41.1749	13.7250	0.92	0.4383

**Anexo 17.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso seco de raíz.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	3607.7468	150.3228	84.31	0.0001
Error	63	112.3327	1.7831		
Total	87	3720.0795			
$r^2 = 0.9698$		C. V. = 8.4234			

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	3605.7245	171.7012	96.30	0.0001
Repetición	3	2.0223	0.6741	0.38	0.7691

**Anexo 18.** Análisis de varianza del experimento 3 por factores considerando como variable respuesta peso seco de raíz.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	17	2630.5763	154.7398	81.58	0.0001
Error	54	102.4325	1.8969		
Total	71	2733.0088			
$r^2 = 0.9625$		C. V. = 8.7377			

F. V.	G. L.	S. C. Tipo	C. M.	F	Prob > F
III					
Larvas	2	1648.9425	824.4713	434.64	0.0001
Control	2	88.0808	44.0404	23.22	0.0001
Form	1	598.0035	598.0035	315.25	0.0001
Larv x Cont	4	37.2217	9.3054	4.91	0.0019
Larv x Form	2	48.8269	24.41	12.87	0.0001
Cont x Form	2	162.6786	81.3393	42.88	0.0001
Larv x Cont x Form	4	46.8222	11.7056	6.17	0.0004

**Anexo 19.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso húmedo total.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	2858830.2764	119117.9282	742.59	0.0001
Error	63	10105.6844	160.4077		
Total	87	2868935.9608			
$r^2 = 0.9965$		C. V. = 2.0943			
F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	2858293.0633	136109.1935	848.52	0.0001
Repetición	3	537.2131	179.0710	1.12	0.3492

**Anexo 20.** Análisis de varianza del experimento 3 considerando como variable respuesta peso seco total.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	24	82104.4281	3421.0178	112.59	0.0001
Error	63	1914.2864	30.3855		
Total	87	84018.7145			
$r^2 = 0.9772$		C. V. = 4.5265			
F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Tratamiento	21	82050.3945	3907.1616	128.59	0.0001
Repetición	3	54.0336	18.0112	0.59	0.6220

**Anexo 21.** Análisis de varianza del experimento 3 por factores considerando como variable respuesta peso seco total.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	17	60385.2590	3552.0741	118.22	0.0001
Error	54	1622.5575	30.0474		
Total	71	62007.8165			
$r^2 = 0.9738$		C. V. = 4.5026			

F. V.	G. L.	S. C. Tipo III	C. M.	F	Prob > F
Larvas	2	36525.1503	18262.5751	607.79	0.0001
Control	2	2980.5336	1490.2668	49.60	0.0001
Form	1	13276.3513	13276.3513	441.85	0.0001
Larv x Cont	4	1366.2614	341.5653	11.37	0.0001
Larv x Form	2	1730.8575	865.4288	28.80	0.0001
Cont x Form	2	3490.8358	1745.4179	58.09	0.0001
Larv x Cont x Form	4	1015.2692	253.8173	8.45	0.0001

**Anexo 22.** Cambios en peso fresco de raíz de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso fresco de raíz (gr)	
0	----	----	66.2	a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	65.2	a
4	8	cadáver	64.7	ab
4	----	----	54.6	bc
4	9	cadáver	52.7	cd
12	7	cadáver	45.9	cde
8	7	cadáver	44.6	cde
4	8	pellet	43.6	de
8	8	cadáver	43.6	de
4	7	pellet	43.1	de
4	9	pellet	42.6	de
8	9	cadáver	35.8	ef
8	9	pellet	32.1	f
12	8	cadáver	32.0	f
8	----	----	31.7	f
8	7	pellet	31.5	f
8	8	pellet	30.7	f
12	9	cadáver	29.4	f

12	9	<i>pellet</i>	18.1	g
12	7	<i>pellet</i>	18.0	g
12	8	<i>pellet</i>	17.9	g
12	----	----	17.1	g

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Anexo 23.** Cambios en peso seco de raíz de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso seco de raíz (gr)	
0	----	----	26.6	a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	26.5	a
4	8	cadáver	25.4	a
4	9	<i>pellet</i>	20.8	b
4	----	----	20.0	b
4	9	cadáver	19.8	b
4	8	<i>pellet</i>	19.6	b
4	7	<i>pellet</i>	19.5	b
12	7	cadáver	19.4	b
8	7	cadáver	19.3	b
8	8	cadáver	19.2	b
8	9	cadáver	14.5	c
8	9	<i>pellet</i>	13.2	c
8	----	----	12.4	c
112	9	cadáver	11.8	c
8	7	<i>pellet</i>	11.7	c
8	8	<i>pellet</i>	11.6	c
12	8	cadáver	11.5	c
12	9	<i>pellet</i>	6.4	d
12	8	<i>pellet</i>	6.4	d
12	7	<i>pellet</i>	6.3	d
12	----	----	5.9	d

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Anexo 24.** Peso seco de raíz de plantas de maíz por niveles de los factores.

Factor	Peso seco de raíz (gr)
Número de larvas	
4	21.9 a <sup>1</sup>
8	14.9 b
12	10.3 c
Época de control	
7 hojas	17.1 a
8 hojas	15.6 b
9 hojas	14.4 c
Formulación	
Cadáver	18.6 a
<i>Pellet</i>	12.8 b

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Anexo 25.** Cambios en peso fresco total de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso fresco total (gr)	
0	----	----	852.6	a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	847.3	a
4	8	cadáver	845.5	a
4	9	cadáver	763.4	b
12	7	cadáver	758.6	b
8	7	cadáver	756.5	b
8	8	cadáver	754.9	b
4	----	----	754.0	b
4	9	<i>pellet</i>	751.3	b
4	7	<i>pellet</i>	751.1	b
4	8	<i>pellet</i>	748.8	b
8	9	cadáver	489.4	c
12	8	cadáver	458.8	cd
8	7	<i>pellet</i>	454.2	d
8	9	<i>pellet</i>	453.6	d
8	8	<i>pellet</i>	451.0	d
8	----	----	448.2	d
12	9	cadáver	441.9	d
12	9	<i>pellet</i>	386.2	e
12	7	<i>pellet</i>	384.4	e
12	8	<i>pellet</i>	384.0	e
12	----	----	367.7	e

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).



**Anexo 26.** Cambios en peso seco total de plantas de maíz sometidas a diferentes densidades de larvas de *Phyllophaga vetula* y momentos de aplicación del nematodo *Steinernema glaseri* en diferentes formulaciones.

No. de larvas	Aplicación del nematodo (No. de hojas)	Formulación	Peso seco total (gr)	
0	----	----	166.8	a <sup>1</sup>
4	7	cadáver	166.4	a
4	8	cadáver	165.0	a
4	----	----	145.8	b
12	7	cadáver	145.2	b
4	9	<i>pellet</i>	145.2	b
4	8	<i>pellet</i>	144.1	b
4	9	cadáver	143.6	b
4	7	<i>pellet</i>	142.9	b
8	8	cadáver	142.8	b
8	7	cadáver	140.0	b
8	9	cadáver	113.2	c
12	8	cadáver	104.4	cd
8	9	<i>pellet</i>	103.8	cd
8	----	----	102.7	cd
8	8	<i>pellet</i>	102.6	cd
8	7	<i>pellet</i>	102.2	cd
12	9	cadáver	97.0	d
12	7	<i>pellet</i>	78.4	e
12	9	<i>pellet</i>	78.1	e
12	8	<i>pellet</i>	76.0	e
12	----	----	72.3	e

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Anexo 27.** Peso seco total de plantas de maíz  
por niveles de los factores

Factor	Peso seco total (gr)	
Número de larvas		
4	151.2	a <sup>1</sup>
8	117.4	b
12	96.5	c
Momento de control		
7 hojas	129.2	a
8 hojas	122.5	b
9 hojas	113.5	c
Formulación		
Cadáver	135.3	a
<i>Pellet</i>	108.1	b

<sup>1</sup> valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Anexo 28.** Análisis de correlación entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca.

Estadísticos simples

Variable	N	Media	Desviación estándar	Suma	Mínimo	Máximo
Número de larvas	4	6.00	5.16	24.00	0	12.00
% de pérdida de peso	4	24.53	23.78	98.13	0	52.26

Coefficientes de correlación de Pearson

Número de larvas	Número de larvas 1.00000 0.0	% de pérdida de peso 0.98864 0.0114
% de pérdida de peso	0.98864 0.0114	1.00000 0.0

**Anexo 29.** Análisis de regresión lineal entre las variables número de larvas y porcentaje de pérdida de materia seca.

Análisis de varianza.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	Prob > F
Modelo	1	1658.2517	1658.2516	86.537	0.0114
Error	2	38.3249	19.1624		
Total	3	1696.5766			

$r^2 = 0.9774$        $r^2$  ajustada = 0.9661      C. V. = 17.84

Parámetros estimados

Variable	G. L.	Parámetro estimado	Error estandar	T para HO: Parámetro = 0	Prob >  TI
Intercepto	1	-2.7851	3.6624	-0.760	0.5264
No. de larvas	1	4.5528	0.4894	9.303	0.0114