

Efecto de nematodos entomopatógenos en ninfas de *Aeneolamia albofasciata* y su persistencia en suelos cañeros de Veracruz

Oscar Parada Domínguez¹
Raquel Alatorre Rosas¹
Ariel Wilbert Guzmán Franco¹
Francisco Hernández Rosas^{2§}
Luz Irene Rojas Avelizapa³
Víctor Manuel Ruíz Vera⁴

¹Posgrado en Fitosanidad, Entomología y Acarología-Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. ²Programa de Innovación Agroalimentaria Sustentable-Campus Córdoba-Colegio de Postgraduados. Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz. CP. 94953. ³Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Campus Peñuela-Universidad Veracruzana. Carretera Peñuela-Amatlán km 177, Córdoba, Veracruz. CP. 94500. ⁴Programa de Innovación en el Manejo de Recursos Naturales-Campus San Luis Potosí-Colegio de Postgraduados. Iturbide 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. CP. 78600.

§Autor para correspondencia: fhrosas@colpos.mx.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de los nematodos, *Heterorhabditis* sp. (CPVG13) y *Steinernema* spp. (CPVC12, CPVC13) sobre el salivazo, *Aeneolamia albofasciata* y determinar su persistencia en el suelo de tres ingenios azucareros Potrero, Constanza y Motzorongo, del estado de Veracruz. En el primer experimento la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos se evaluó en ninfas de mosca pinta, *A. albofasciata* de 3° y 4° instar, se aplicaron 120 (juveniles infectivos) JI/ninfa sobre cajas con seis cavidades, cubiertas previamente con papel filtro, cada cavidad contenía un estolón de pasto (*Cynodon* sp.) y una ninfa por cavidad. En el segundo experimento, se evaluó la persistencia de los nematodos entomopatógenos (NEPs) en suelo, el experimento tuvo una duración de 70 días, con evaluaciones semanales independientes, de 32 unidades experimentales por semana. El experimento de patogenicidad reveló que ambos nematodos fueron capaces de atravesar la saliva que protege a las ninfas, matar y desarrollarse en los cadáveres produciendo nueva progenie de JI. La mortalidad más alta (62.5%) se observó con *Heterorhabditis* (CPVG13), produciendo además la mayor concentración de JI por ninfa (3500JI/ninfa). Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de persistencia entre *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema* (CPVC12). Se encontró un efecto significativo del suelo en la supervivencia de ambos nematodos. El aislamiento que persistió más en suelo fue el *Steinernema* comparado con el de *Heterorhabditis* (CPVG13). Profundizar en estos estudios, permitirá determinar el impacto de la interacción entre salivazo-NEPs y el suelo.

Palabras clave: caña de azúcar, nematodos entomopatógenos, salivazo.

Recibido: febrero de 2019

Aceptado: abril de 2019

Introducción

El salivazo, *Aeneolamia albofasciata* (Lallemand) (Hemiptera Cercopidae), es una de las plagas más dañinas de la caña de azúcar. Se presenta en extensas áreas del Golfo de México y zona costera del Océano Pacífico (Flores-Cáceres, 1994; Peck, 2001; Gómez, 2007; López-Collado *et al.*, 2013, Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015). Alatorre-Rosas *et al.* (2013); Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas (2015) mencionan que *A. albofasciata* presenta una distribución altitudinal que va desde 10 a 1 700 msnm. Los efectos generados por la alimentación de ninfas y adultos ocasionan estrés hídrico, retrasa el crecimiento de la planta, reduciendo la producción de biomasa (Dinardo-Miranda *et al.*, 2000; Valerio *et al.*, 2001; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015). *A. albofasciata* ocasiona pérdidas hasta de 9 t ha⁻¹ de caña de azúcar (De la Cruz *et al.*, 2005; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015).

Las ninfas aparecen pocos días después del inicio de las lluvias y se prolongan durante todo el periodo lluvia, apareciendo picos poblacionales de ninfas y adultos de manera escalonada y superpuestas. Las ninfas recién eclosionadas inician la producción de saliva, misma que las cubre totalmente, les confiere refugio, sirve como defensa contra sus enemigos naturales y al mismo tiempo de protección contra condiciones climáticas adversas (Marshall, 1966; Whittaker, 1970; Bodegas, 1973; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015).

Para el control de adultos se recomienda el uso de insecticidas en infestaciones severas y del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) (Torriello *et al.*, 2008; Hernández-Rosas *et al.*, 2013; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015). El uso de *M. anisopliae* como insecticida biológico se ha generalizado en diferentes áreas cañeras, para la regulación de adultos (Flores-Cáceres, 1994; Berlanga *et al.*, 1997; Badilla, 2002; Carballo y Falguni, 2004; Castillo-Zeno 2006; Bustillo y Castro, 2011; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015). A la fecha, se cuenta con formulados en polvo humectable de inertes con esporas de *M. anisopliae* y aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos para la regulación de poblaciones de ninfa o salivazo, debido que la saliva es una barrera efectiva contra enemigos naturales y otras estrategias de control (Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015; Grifaldo-Alcántara *et al.*, 2017).

Los nematodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* han generado interés como estrategia de control biológico de ninfas de diferentes especies de salivazo, en este sentido las especies *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. contra el salivazo, *Mahanarva fimbriolata* han logrado mortalidades entre 96 y 100% bajo condiciones de laboratorio (Leite *et al.*, 2002). Estudios de campo, demostraron que *Heterorhabditis* spp. en dosis de 5 x 10¹⁰ JI/h ocasionó mortalidades de 42.3% y con *H. bacteriophora* en dosis de 1.5 x 10¹¹ JI/ha, la mortalidad sobre ninfas de *A. varia* fue 76% (Moreno *et al.*, 2012).

Los factores abióticos pueden tener un efecto positivo o negativo en el desempeño, efectividad y nivel de éxito de los nematodos entomopatógenos en el control de insectos plaga. Es por ello que la aplicación de nematodos entomopatógenos puede resultar impredecible en condiciones naturales. En este sentido (Kaya, 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Smith, 1996) mencionan la importancia de tomar en cuenta los factores intrínsecos: comportamiento y fisiológicos, así como temperatura, humedad, textura de suelo y radiación (extrínsecos), además de factores bióticos como la competencia, que afectan su persistencia.

Por tal razón, resulta importante la realización de este estudio con algunos indicadores que permitan evaluar el tipo de suelo, la diversidad biológica y determinar el efecto sobre la permanencia de los nematodos entomopatógenos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos de *Steinernema* spp. (CPVC12; CPVC13) y *Heterorhabditis* sp. (CPVG13) y su persistencia en suelo procedentes de tres ingenios azucareros del estado de Veracruz.

Material y métodos

Susceptibilidad de ninfas de *A. albofasciata* hacia nematodos entomopatógenos ninfas de *A. albofasciata*

Las ninfas de tercer y cuarto instar de *A. albofasciata* fueron colectadas de campo con caña cultivada en Atoyaquillo del ingenio El Potrero, coordenadas 18° 59' 38.74 latitud norte y 96° 46' 50 longitud oeste. Las ninfas fueron colectadas con apoyo de espátulas de acero inoxidable, fueron separadas por género y colocadas en forma individual en placas de plástico con cavidades, que contenían en su interior papel toalla humedecido y estolones de pasto estrella (*Cynodon* sp.). Una prueba preliminar con estolones de pasto mostró que en la zona de los nudos se forman raicillas de diferente longitud, que permanecen activas durante varios días (10-12). Se consideró que si las ninfas podían adherirse a las raicillas y mantenerse al menos 4-5 días produciendo la excreción de saliva, constituiría un periodo favorable para los ensayos planteados en esta investigación.

Las ninfas colectadas fueron trasladadas al laboratorio y mantenidas en observación durante 24 h, fueron seleccionadas aquellas que sobrevivieron al manejo. Posteriormente, cada ninfa fue confinada individualmente en cajas Costar® (Corning Inc. NY USA) con 6 cavidades, cubiertas con papel filtro humedecido y un estolón de pasto (como alimento). Durante el experimento, las ninfas fueron mantenidas a temperatura ambiente. Las ninfas que sobrevivieron y continuaron produciendo saliva fueron usadas en el experimento, debido a su adaptación al espacio y cambio de alimento.

Nematodos entomopatógenos

Los aislamientos de nematodos utilizados para esta investigación fueron obtenidos de larvas de *G. mellonella* que fueron usadas como insecto cebo en muestras de suelo procedentes de tres ingenios azucareros del estado de Veracruz, México (Central Progreso, Constancia y La Gloria). Los experimentos fueron llevados a cabo con dos aislamientos de *Steinernema* sp. (CPVC12, CPVC13) y uno de *Heterorhabditis* sp. (CPVG13) (Cuadro 1). La determinación taxonómica morfológica y molecular de los aislamientos se encuentra en proceso y se reportará en un artículo posterior.

Cuadro 1. Nematodos utilizados para la prueba de patogenicidad.

Tratamiento	UE (una placa)	Réplicas (placas)	Ninfas totales (réplica)	Repeticiones en tiempo	Total ninfas/UEs	Total de placas
1. <i>Steinernema</i> (CPV12)	1	4	24	2	48	8
2. <i>Steinernema</i> sp. (CPVC13)	1	4	24	2	48	8
3. <i>Heterorhabditis</i> (CPVG13)	1	4	24	2	48	8
4. Control (sin nematodos)	1	4	24	2	48	8
Totales		16	96		192	32

Los nematodos fueron propagados sobre larvas de último instar de *G. mellonella* (L.) y cosechados como juveniles infectivos (JI) mediante el método de trampas White (Kaya y Stock, 1997), se esterilizaron con cloruro de benzalconio al 0.01% y dos cambios de agua destilada estéril. La suspensión de juveniles infectivos (JI) se centrifugó a 500 rpm durante 5 min, con el fin de eliminar los nematodos muertos por decantación del sobrenadante. Los nematodos se conservaron a temperatura ambiente, en agua destilada, oxigenándolos con una bomba de pecera continuamente para disminuir la mortalidad. La concentración de JI en suspensión fue estimada usando alícuotas de 20 μ L, utilizando el promedio de 7 conteos, ajustando la concentración requerida en la experimentación.

Procedimiento experimental

El proceso de inoculación de los diferentes aislamientos fue el mismo (Cuadro 1). Se utilizaron placas Costar[®] con 6 cavidades. Cada cavidad se cubrió con dos capas de papel filtro previamente esterilizado y humedecido. En cada cavidad se colocó un estolón (3.5 cm) de pasto estrella (*Cynodon* sp.) donde se indujo la formación de raicillas, sobre estos se colocó una ninfa de *A. albofasciata*. La inoculación se llevó a cabo aplicando una sola concentración de juveniles infectivos, 120 JI cm^{-2} de acuerdo a Alves *et al.* (2005). La aplicación se realizó sobre el papel filtro, permitiendo el desplazamiento de los JI y búsqueda del insecto hospedero.

Los tratamientos se incubaron a 25 ± 2 °C y humedad relativa (74% min y 84% max) y fotoperiodo de 9 y 15 h luz-oscuridad. En el testigo, las ninfas fueron tratadas solamente con agua estéril. Las ninfas se revisaron cada 48 h y se determinó mortalidad por placa tomando en cuenta los síntomas (color rojo o beige, flacidez) de las ninfas. Cada ninfa muerta se retiró de la placa y se colocó en cámara húmeda, la cual consistió en una caja Petri con papel filtro humedecido, se determinó la emergencia de los JI por ninfa infectada. Los JI se colectaron durante un periodo de 4 a 5 días y se determinó el total de JI en 10 ml de la suspensión colectada por ninfa. Este valor se tomó como indicativo de la capacidad reproductiva de los nematodos. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones (cuatro placas/24 ninfas) y todo el experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. El experimento tuvo una duración de 7 días después de la aplicación de los juveniles infectivos. Toda la fase de laboratorio se realizó bajo condiciones asépticas.

Efecto del suelo con la persistencia de nematodos entomopatógenos

Se seleccionaron muestras de suelo de 8 sitios, dos pertenecientes al ingenio Constancia, dos a Central Motzorongo y cuatro a El Potrero. Las muestras de suelo fueron tomadas en un área de 30 x 30 cm de largo por ancho y de aproximadamente 10 cm de profundidad usando una pala. De cada sitio se obtuvieron trece muestras (un total de 5 kg) y fueron conservadas a 4 °C durante no más de dos semanas. Se prepararon muestras compuestas, combinando las 13 sub muestras de cada sitio por ingenio.

Para evitar el efecto de nematodos nativos en el experimento de persistencia, se llevó a cabo un muestreo en los suelos usando el método de insecto cebo con *G. mellonella* (Zimmerman, 1986). Cada muestra de suelo, fue humedecida con agua destilada estéril a capacidad de campo (60%). Se tomaron muestras de 500 g de cada localidad colocándolas en recipientes de plástico de 500 mL de capacidad (unidad experimental), siete larvas de *G. mellonella* del último instar fueron confinadas en forma individual en jaulas de malla metálica e introducidas en los recipientes con suelo y

distribuidas al azar. Cada recipiente se cubrió con una tapa con perforaciones para permitir la aireación constante, los recipientes fueron invertidos (Miduturi y Moens, 1997) e incubados en una cámara de cría a 25 ± 2 °C durante 7d, para confirmar la presencia de nematodos nativos. Este procedimiento se repitió dos veces.

Poblaciones microbianas cultivables

Dentro de la primera semana de colecta, las poblaciones naturales de bacterias, hongos y actinomicetos de cada muestra de suelo fueron estimadas. Muestras de 10 g de suelo de cada localidad, tamizadas en malla No. 10, se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 90 mL de agua destilada estéril. Las muestras se agitaron durante 18 minutos en un agitador orbital (Thermolyne Cimarec® 3), para posteriormente preparar diluciones seriadas (Dhingra y Sinclair, 1985). Un factor final de dilución de 10^{-3} y 10^{-5} se consideró adecuado para el aislamiento de hongos, 10^{-4} y 10^{-6} para bacterias y actinomicetos 10^{-3} y 10^{-5} .

Se realizó una siembra por extensión en placa en cajas Petri con agar nutritivo (NA) para bacterias, papa dextrosa agar (PDA) para hongos y medio agar Czapeck Dox con pH de 8.0 para actinomicetos con tres repeticiones por dilución. Las placas se incubaron a 27 °C/5d, 7d y 10d para las bacterias, hongos y actinomicetos, respectivamente. Después del periodo de incubación, el número de unidades formadoras de colonia (UFC) fue estimado seleccionando la dilución en cada medio que favorecía la enumeración adecuada (10^{-3} para bacterias y hongos y 10^{-6} para actinomicetos). Las UFC/gramo de suelo seco (al aire) se calcularon al multiplicar el promedio aritmético del número de UFC por placa por el factor de dilución. El resultado se dividió entre el peso de suelo seco estimado. Las características físicas y químicas del suelo fueron llevadas a cabo por el Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Programa de Edafología, Colegio de Postgraduados.

Procedimiento experimental

Para este experimento, se empleó suelo de los ingenios El Potrero, Central Motzorongo y Constanca, estos se seleccionaron porque no se registró la presencia de nematodos. Se emplearon dos aislamientos, CPVC12 (*Steinernema* spp.) y CPVG13 (*Heterorhabditis* sp.). El procedimiento fue el mismo para cada tipo de suelo y nematodo evaluado. Para cada combinación de suelo y nematodo, se prepararon 22 envases con 500 g de suelo cada uno, en el centro de 11 de los envases, se depositaron 5 000 juveniles infectivos, suspendidos en 2.5 mL de agua destilada estéril (ADE), en los 11 envases restantes únicamente se depositó 2.5 mL de ADE siendo estos el tratamiento testigo.

La supervivencia de los nematodos se cuantificó mediante la proporción de larvas de *G. mellonella* infectadas al estar en contacto con suelo inoculado por nematodos. Para esto, en dos envases, con y sin nematodos, se introdujeron en siete jaulas hechas de malla metálica en cada envase. Las jaulas de 1 cm de diámetro por 4 cm de longitud contenían una larva de *G. mellonella*. Siete días después, se repitió este procedimiento usando dos envases diferentes (con y sin nematodos) y así sucesivamente a los 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70d posteriores a la inoculación de los nematodos. El experimento se incubó a 25 °C en oscuridad total. Las larvas de *G. mellonella* se dejaron en contacto con el suelo durante 6d y después se retiraron del suelo y se cuantificó el número de larvas muertas.

Cada larva fue colocada en una cavidad de una placa de seis cavidades conteniendo papel filtro húmedo, e incubadas a las mismas condiciones experimentales. La presencia de juveniles infectivos (JI) fue determinada mediante observaciones entre los 10 a 15d. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, donde cada combinación de suelo/nematodo conto con dos replicas, y el experimento se repitió en dos ocasiones (cuatro repeticiones en total).

Los datos se analizaron usando regresión logística (asumiendo que los datos tuvieron una distribución binomial), donde cada número de larvas muertas fue una proporción del total de larvas evaluadas. Cuando fue necesario, la presencia de mayor dispersión de los datos bajo el supuesto de la distribución binomial se permitió, comparando la proporción de la desviación media de los tratamientos y la desviación media residual contra una distribución F, en lugar de comparar la desviación de los tratamientos con una distribución de χ^2 . Antes de comparar entre tratamientos, los resultados entre repeticiones en tiempo fueron comparados para poder ser combinados. Con los datos de las repeticiones combinadas, primero se comparó la supervivencia entre aislamientos de nematodos, entre los 4 tipos de suelo, entre los tiempos de evaluación y finalmente la interacción entre estos factores. El análisis se realizó en el programa GenStat v. 8 (Payne *et al.*, 2005).

Resultados

Susceptibilidad de ninfas de *A. albofasciata* contra *Heterorhabditis* sp. y *Steinernema* spp.

De manera general se observaron diferencias en mortalidad causada por *Steinernema* spp. (CPVC12; CPVC13) y *Heterorhabditis* sp. (CPVG13). El porcentaje de mortalidad (62.5%) fue mayor para *Heterorhabditis* sp. a 25°C, comparado con *Steinernema* (CPVC12) (56.25%) y *Steinernema* sp. (CPVC13) (33.33%). A pesar de que se observó mortalidad en los tratamientos no fue posible realizar un análisis estadístico, ya que el tratamiento testigo mostro alta mortalidad por otras causas. Sin embargo, este experimento permitió demostrar que los aislamientos tanto de *Steinernema* como de *Heterorhabditis* tuvieron la capacidad de atravesar la saliva producida por las ninfas, penetrar la cavidad del insecto y causar infección (Figura 1b, 1c).

Las disecciones de los cadáveres de ninfas infectadas permitieron verificar la capacidad reproductiva de los nematodos entomopatógenos (Figura 1d, 1e). Las ninfas expuestas a *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema* sp. (CPVC12) mostraron diferencias en abundancia de juveniles infectivos. En el caso de *Heterorhabditis* la proporción más alta correspondió a 3 500 JI por ninfa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estimación del número de ninfas infectadas y JI encontrados en ninfas de *A. albofasciata*.

Especie NEP/repetición	larvas infectadas	Población de JI/ninfa	
		Mínima	Máxima
<i>Steinernema</i> R1	13	4	1 500
<i>Steinernema</i> R2	14	7	1 500
<i>Heterorhabditis</i> 1	12	1 000	3 500
<i>Heterorhabditis</i> 2	18	10	3 500
S. (Contancia) 1	6	9	1 000
S. (Constancia) 2	10	4	1 000
Control	0	-	-

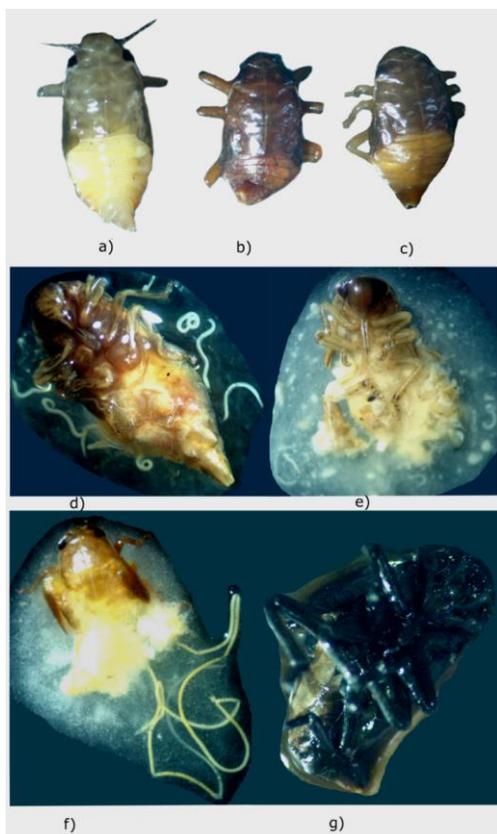


Figura 1. Ninfas de mosca pinta: a) ninfa sana; b) ninfa infectada por *Heterorhabditis*. (CPVG13); c) infectada por *Steinernema* (CPV12). Disecciones realizadas a ninfas parasitadas; d) nematodos adultos de (CPVG13) *Heterorhabditis*; e) nematodos adultos de (CPV12) *Steinernema*; f) nematodos mermitidos; y g) ninfas con presencia de necrosis, posible presencia de bacterias.

Poblaciones microbianas cultivables

La mayor población de bacterias y hongos se presentó en suelo de Constanica (3×10^9 UFC g^{-1} de suelo y 1.5×10^4 UFC g^{-1} de suelo para bacterias y hongos, respectivamente) (Figura 2a) mientras que en Central Motzorongo la proporción de bacterias (3×10^8 UFC) y hongos (4×10^4 UFC g^{-1} de suelo) fue considera baja (Figura 2b). La mayor población de actinomicetos se encontró en el sitio 2 del ingenio El Potrero (7×10^5 UFC g^{-1} de suelo) y la menor población se obtuvo en Constanica (8.6×10^4 UFC g^{-1} de suelo) y Motzorongo (1.7×10^5 UFC g^{-1} de suelo) (Figura 2c). Las características físicas y químicas del suelo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características fisicoquímicas del suelo de tres ingenios azucareros.

Identificación	pH	CE	MO (%)	N*	P	K	Textura Boyoucos
PotreroS1	4.8	0.32	1.7	0.09	41	0.4	Arcilla
PotreroS2	5.1	0.28	5.4	0.27	64	0.7	Arcilla
PotreroS3	6.4	0.26	3.3	0.16	12	0.3	Franco arcilloso
PotreroS4	5.3	0.14	5.3	0.26	15	0.3	Arcilla

Identificación	pH	CE	MO (%)	N*	P	K	Textura Boyoucos
ConstanciaS1	5.9	0.21	3.7	0.19	39	0.3	Franco arcilloso
ConstanciaS2	6.5	0.16	5.3	0.26	31	0.4	Arcilla
MotzorongoS1	5.2	0.21	2.2	0.11	23	0.6	Franco arcilloso
MotzorongoS2	6	0.23	1.4	0.07	18	1	Franco arcillo arenoso

CE= conductibilidad eléctrica; MO= materia orgánica; N= nitrógeno; P= fósforo; K= potasio.

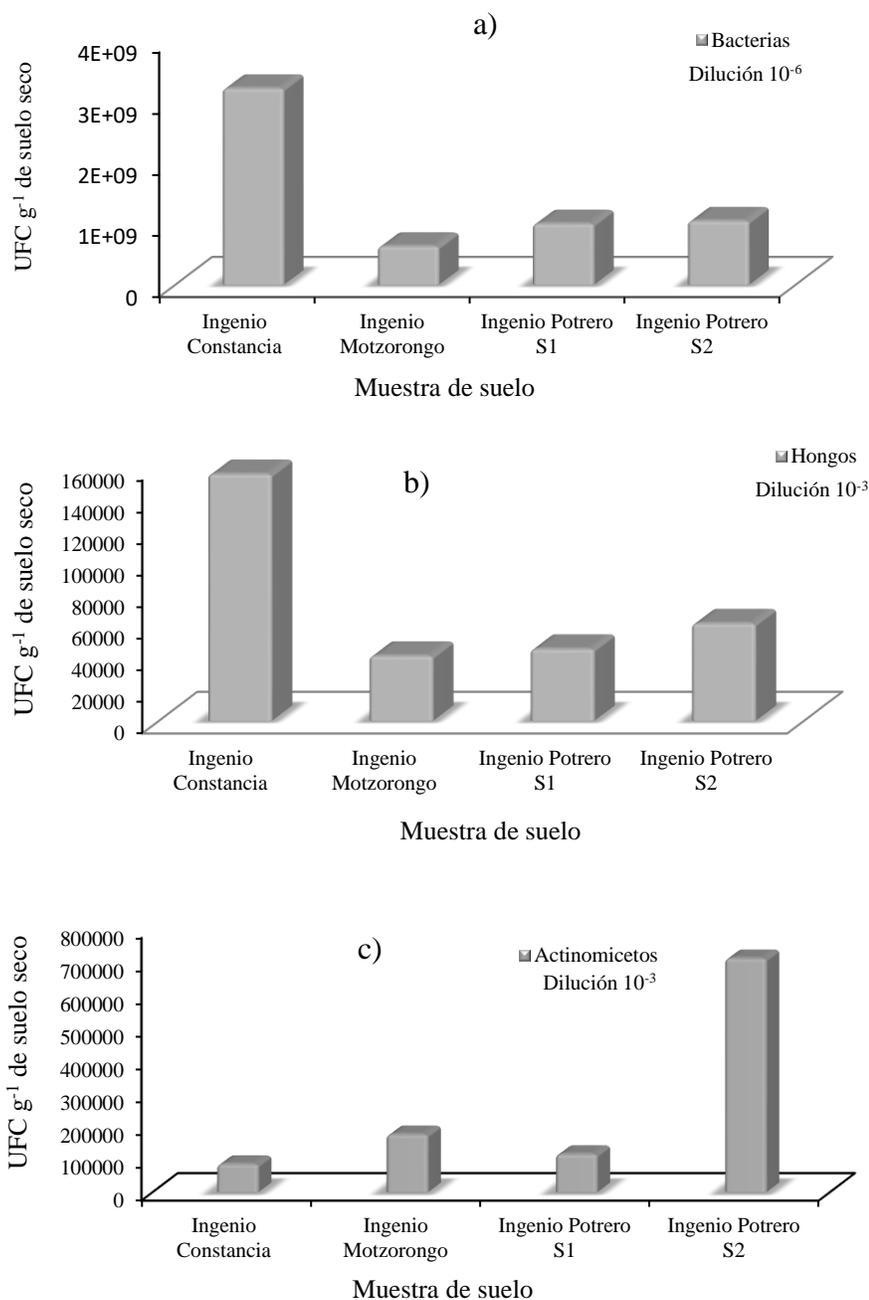


Figura 2. Unidades formadoras de colonias. a) bacterias; b) hongos; y c) actinomicetos, obtenidas de suelo de caña cultivada en el Ingenio Constancia, Central Motzorongo y El Potrero.

Efecto del suelo con la persistencia de nematodos entomopatógenos

No hubo diferencias significativas entre las cuatro repeticiones ($\chi^2_3 = 1.3215, p= 0.427$), esto permitió que los datos se combinaran para hacer un análisis conjunto y ver el efecto de tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de persistencia entre *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema* (CPVC12) ($\chi^2_1 = 64.3496 p < 0.001$). El aislamiento que persistió más fue (CPVC12) de *Steinernema* (Figura 3b) comparado con el aislamiento (CPVG13) de *Heterorhabditis*. Se encontró un efecto significativo del suelo en la supervivencia de ambos nematodos ($\chi^2_3 = 11.2522, p= 0.01$); sin embargo, este efecto fue diferente para cada aislamiento de nematodo ($\chi^2_3 = 17.3337, p < 0.001$), donde *Steinernema* a 8 semanas mostró alta proporción de insectos muertos con alta persistencia de JI, mientras que las inoculaciones con *Heterorhabditis* la persistencia de JI empezó a declinar desde la 5^{ta} semana de la inoculación. El tiempo de los nematodos en el suelo tuvieron un efecto significativo en su supervivencia ($\chi^2_9 = 462.3188, p < 0.001$) y este efecto fue similar para las dos especies de nematodos ($\chi^2_9 = 13.9253, p= 0.125$).

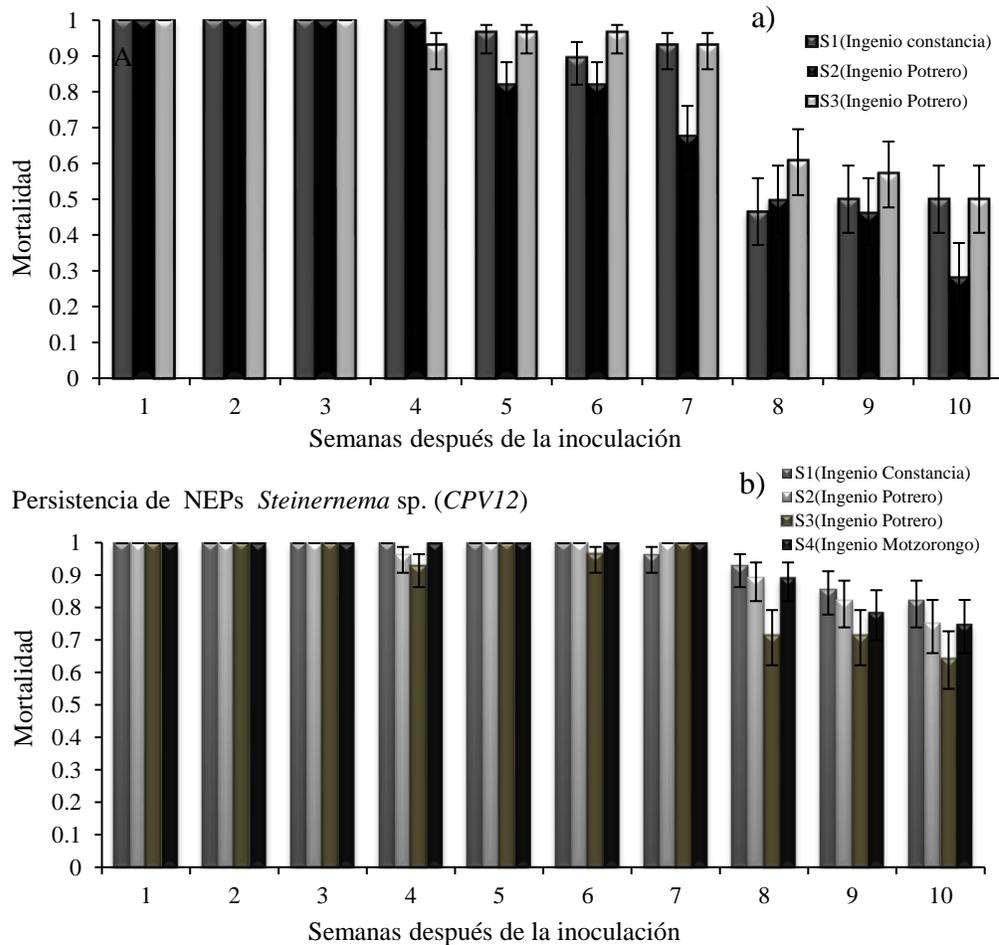


Figura 3. Proporciones de mortalidad a) heterorhabditis sp.; y b) steinernema sp. en larvas de *G. mellonella*. Las barras de error representan límites de confianza de 95%, transformada a partir de la escala logística. La persistencia de JI constituye el valor promedio de larvas muertas de *G. mellonella* por fecha de evaluación a 25 °C.

Discusión

Estos resultados muestran que los aislamientos de nematodos entomopatógenos CPVC13; CPVC12 (*Steinernema*) y CPVG13 (*Heterorhabditis*) pueden infectar ninfas de *Aeneolamia albofasciata*, siendo capaces de atravesar las barreras físicas del insecto, principalmente la masa espumosa de saliva que les sirve de protección. La capacidad de infección de los aislamientos de nematodos utilizados puede ser confirmada por la reproducción de los mismos en su hospedante, especialmente por el aislamiento CPVG13 de *Heterorhabditis* (Cuadro 2), así como por previos reportes de infección en otras especies de hemípteros bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo (Ferrer *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Rosero- Guerrero, 2011; Morero *et al.*, 2012). Se encontró una mayor infección ocasionada por *Heterorhabditis* comparada con *Steinernema*, lo cual podría ser atribuible a que los *Heterorhabditis* tienen la capacidad de penetrar a través de la cutícula del hospedero con la ayuda de un pequeño diente que poseen (Bedding y Molyneux, 1982; Aguilera, 2001). La alta mortalidad de ninfas de *A. albofasciata* en el testigo probablemente haya sido ocasionada por patógenos traídos de campo, así como por la manipulación al momento de ser colectados.

Uno de los factores de mortalidad natural observados en esta investigación fue la presencia de nematodos mermitidos del género *Hexamermis* sp., fenómeno que ya ha sido reportado previamente en *A. varia* (Poinar y Linares, 1985) y *Manhanarva fimbriolata* (Bennett, 1984). Por esta razón, se considera importante que, en futuros experimentos, el material biológico proceda de colonias de insectos mantenidos en condiciones controladas, evitando con ello alta mortalidad durante el bioensayo y obtener resultados estadísticamente confiables.

En el experimento de persistencia de nematodos entomopatógenos, se observaron diferencias significativas entre tratamientos y cepas de nematodos, lo que significa que hubo una disminución de la población inicial de nematodos a través del tiempo. Tanto en *Steinernema* como en *Heterorhabditis* la persistencia de JI medida como la capacidad de matar insectos cebo a través del tiempo, mostró ligeras variaciones desde la cuarta semana, en el caso de *Steinernema* la mortalidad se mantuvo cercana al 100% hasta la séptima semana; sin embargo, en la octava semana, la proporción de mortalidad mostró variaciones 0.65 a 0.9 dependiendo del suelo donde se incubó (Figura 3B). En el caso de *Heterorhabditis* la persistencia de JI mostró variaciones más evidentes en las siguientes semanas. Al igual que *Steinernema*, a partir de la octava semana hubo una reducción en la persistencia de JI, pero en este caso la caída fue más drástica (0.25) (Figura 3B).

Heterorhabditis mostró problemas de persistencia en los diferentes tipos de suelo (Figura 3A), en suelo arcilloso, franco arcilloso y franco arenoso, con pH ácido a neutro (Cuadro 3) *Heterorhabditis* mostró una caída drástica en la curva de mortalidad, lo que significa que el suelo representa un factor importante para la persistencia de este nematodo entomopatógeno (Kung *et al.*, 1990; Portillo-Aguilar *et al.*, 1999).

De acuerdo con (Kaya, 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Epsky *et al.*, 1998) la interacción entre microorganismos del suelo y nematodos entomopatógenos puede afectar la sobrevivencia de los JI, afectar el establecimiento y desarrollo del simbiote y afectar al insecto una vez invadido por el nematodo. Sin embargo, en este estudio se encontraron diferencias en la concentración de bacterias, hongos y actinomicetos presentes en el suelo, que pueden tener relación con la persistencia de los

nematodos entomopatógenos. La interacción nematodo vs microbiota pudo afectar de manera diferente la cepa de nematodos, provocando mayor mortalidad en *Heterorhabditis* (CPVG13). Sin embargo, faltan estudios más profundos para corroborar el efecto del suelo-microbiota sobre la persistencia y actividad parasítica de los nematodos entomopatógenos.

Conclusiones

Los aislamientos de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* tuvieron la capacidad de infectar a ninfas (salivazo) de *Aeneolamia albofasciata*, por su capacidad para atravesar la barrera de saliva espumosa que cubre a la ninfa. Además de mostrar efectividad biológica por su virulencia para desarrollarse y reproducirse en el hospedante. En especial, por el género *Heterorhabditis* (CPVG13).

La persistencia de los aislamientos de *Steinernema* sp., como de *Heterorhabditis* sp., en cuanto a JI en ambos casos se mantuvo, en el caso de *Steinernema* a la séptima semana la mortalidad casi fue al 100%, solo que a la octava semana hubo variaciones entre 0.65 a 0.9 dependiendo del tipo de suelo donde se mantuvo, en cambio *Heterorhabditis* la persistencia de JI fue semejante solo que destacó su caída repentina por la mortalidad que fue más pronunciada y esto se observó tanto en suelo arcilloso, franco arcilloso, y franco arenoso como en pH ácido a neutro.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca a Oscar Parada Domínguez. Este estudio fue financiado por la Fundación Produce Veracruz AC, proyecto nacional: Diseño de un programa contemporáneo de manejo Integrado de mosca pinta en caña de azúcar (2012-2013). Se contó con el apoyo a Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico 2013; a través, del fideicomiso número 167304, Colegio de Postgraduados.

Literatura citada

- Aguilera, M. M. 2001. Nematóides do bem. Cultivar. Grandes culturas. Pelotas. 25:52-54.
- Alatorre-Rosas, R.; Carrillo, B. G.; Grifaldo, A. P. F.; Valdez, C. J.; Guzmán, F. A. W.; Romero, N. J.; Segura, L. O.; Hernández-Rosas, F.; López, C. J. y Villanueva, J. J. A. 2013. Identificación de especies de mosca pinta. Proyecto nacional. Diseño de un programa contemporáneo de manejo integrado de mosca pinta en caña de azúcar. FMP-002. 2 p.
- Alatorre-Rosas, R. y Hernández-Rosas, F. 2015. Mosca pinta, *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae). In: Arredondo-Bernal, H. and Rodríguez del Bosque L. A. Casos de control biológico en México. (Ed.) Colegio de Postgraduados. 141-164 pp.
- Alves, L. F. A.; Rhode, C. y Alves, V. S. 2005. Patogenicidad de *Steinernema glaserie*, *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomol. 34(1):139-141.
- Badilla, F. F. 2002. Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 64:77-87.
- Bedding, R. A. and Molyneux, A. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematológica. 28(3):354-359.

- Bennett, F. D. 1984. Discusión sobre las posibilidades de control biológico de la candelilla. *In*: Seminario problemas de la candelilla y el taladrador de la caña de azúcar y pastos (Barquisimeto, 1984). Unión de productores de azúcar. 39-48 pp.
- Berlanga-Padilla, A. M. y Hernández, V. V. M. 1997. Control microbial de mosca pinta *Aeneolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*. Dirección General de Sanidad Vegetal-Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Ficha técnica. CB-08. 4 p.
- Bodegas, V. P. R. 1973. Aspectos biológicos sobre la mosca pinta de los pastos, con énfasis en el periodo de incubación de los huevecillos de *Aeneolamia occidentalis* (Fennah). Tesis de Maestría en Ciencias. Monterrey, NL. ITESM. 36-111 pp.
- Bustillo, P. A. E. y Castro, V. U. 2011. El salivazo de la caña de azúcar *Aeneolamia varia*. Red Mundial <http://www.cenicaña.org/pdf/serie-divulgativa/sd11/sd.pdf>.
- Carballo, M. y Falgumi, G. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Serie técnica: manual técnico núm. 53. Nicaragua. 232 p.
- Castillo, Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* sp. y *Prosapia* sp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Peten, Guatemala. Tesis de Maestría en Ciencias. CATIE. 7 p.
- De la Cruz, L. J. J.; Vera, G. J.; López, C. J.; Pinto, V. M. and Garza, G. R. 2005. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 44(1):91-93.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1985. Basic plant pathology methods, CRC Press Inc., Boca Raton. 448 pp.
- Dinardo, M. L. L.; Ferreira, J. M. G. e Carvalho, P. A. M. 2000. Influência das cigarrinhas das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos. 19(2):34-35.
- Epsky, N. D.; Walter, D. E. and Capinera, J. L. 1998. Potential role of nematophagus microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Econ. Entomol.* 81(3):821-825.
- Ferrer, F.; Arias, M.; Trelles, A.; Palencia, G.; Navarro, J. y Colmenares, R. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 72:39-43.
- Flores, C. S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. Servicios gráficos OREL. Primera Edición. Veracruz, México. 350 p.
- Gómez, L. A. 2007. Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el valle del río Cauca. Cenicña, Cali, Colombia. 10-17 pp.
- Grifaldo, A. P. F.; Alatorre, R. R.; Segura, L. O. and Hernández, R. F. 2017. *Steinernema ralatorei* n. sp. Isolated from sugarcane areas at Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist*. 42(1):171-190.
- Hernández, R. F.; Cruz, T. M.; Pacheco, C. R.; González, V. G. T. and Ortíz, M. J. 2013. Esporas de *M. anisopliae* y efecto en mosca pinta. Proyecto nacional. Diseño de un programa contemporáneo de manejo integrado de mosca pinta en caña de azúcar. FMP-008. 2 p.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. *In*: Gaugler, R. and Kaya, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL. 93-116 pp.
- Kaya, H. K. and Koppenhöfer, A. M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Bio. Sci. Technol.* 6(3):333-345.
- Kaya, H. K. and Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. *In*: Lacey, L. A. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, New York. 281-324 pp.

- Kung, S. P.; Gaugler, R.; Kaya, H. K. and Vail, P. 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebrate Pathol.* 55(3):401-406.
- Leite, L. G.; Machado, L. A.; Aguilera M. M.; Rodrigues R. C. D. and Negrisoli, A. S. Jr. 2002. Patogenicidad de *Steinernema*, *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). *Rev. Agric.* 78(1):139-148.
- Leite, L. G.; Machado, L. A.; Goulart, R. M.; Tavares, F. M. and Filho, B. A. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae) *Neotropical Entomol.* 34(5):785-790.
- López, C. J.; Pérez, A. W. A.; Villanueva, J. J. A. and Hernández, F. F. 2013. Distribución de especies de mosca pinta y su riesgo potencial. Proyecto nacional. Diseño de un programa contemporáneo de manejo integrado de mosca pinta en caña de azúcar. FMP-003. 2 p.
- Marshall, T. A. 1966. Spittle-production and tube-building by cercopid larvae (Homoptera) IV. Mucopolysaccharide associated with spittle-production. Department of Zoology. University of Hong Kong China. *J. Insect Physiol.* 12(6):635-644.
- Miduturi, J. S. and Moens, M. 1997. Distribution of entomopathogenic nematodes in grassland. *Russian J. Nematol.* 5(1):67-70.
- Moreno, A. C.; Bustillo, P. E. A.; Núñez, L. C. J.; Valderrama, C. U. and Ramírez, S. D. G. 2012. Virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Rev. Colomb. Entomol.* 38(2):260-265.
- Payne, R. W.; Murray, D. A.; Harding, S. A.; Baird, D. B. and Soutar, D. M. 2005. *GenStat for Windows*. 8th (Ed.). Introduction VSN International, Hemel Hempstead.
- Peck, C. D. 2001. Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homoptera: Cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. *Rev. Colomb. Entomol.* 27(3-4):129-136.
- Poinar, G. O. and Linares, B. 1985. *Hexameris dactylocerus* sp. n. (Mermithidae: Nematoda) a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homoptera) in Venezuela. *Revue de Nematologie.* 8(2):109-111.
- Portillo, A. C.; Villani, M. G.; Tauber, M. J.; Tauber, C. A. and Nyrop, J. P. 1999. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environ. Entomol.* 28(6):1021-1035.
- Rosero, G. M. 2011. Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia* (F) (Hemiptera: Cercopidae). Tesis Magister en Ciencias Agrarias, énfasis protección de cultivos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Sede Palmira- Escuela de Posgrados. Universidad Nacional de Colombia. Cenicafé. 80 p.
- Smith, P. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Bio. Sci. Technol.* 6:379-387.
- Valerio, J. R.; Cardona, C.; Peck, D. C. and Sotelo, G. 2001. Spittlebugs: bioecology, host plant resistance and advances in IPM. In: proceedings of the 19th International Grass Congress, 11-21 February 2001, Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil. CENARGEN, EMBRAPA, Brasilia. 217-221 p.
- Whittaker, B. J. 1970. Cercopid spittle as a microhabitat. Department of biological sciences. University of Lancaster. Copenhagen. *OIKOS.* 21(1):59-64.
- Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* baits method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomol.* 102(1-15):213-215.