



**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES NATIVAS DE NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS (RHABDITIDA) ASOCIADOS A CULTIVOS DE
CHONTADURO, *Bactris gasipaes* Kunth MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y
ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

MABELL ROCIO OROBIO MOSQUERA

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2012**



**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES NATIVAS DE NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS (RHABDITIDA) ASOCIADOS A CULTIVOS DE
CHONTADURO, *Bactris gasipaes* Kunth MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y
ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

MABELL ROCIO OROBIO MOSQUERA

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

DIRECTOR

ANA MILENA CAICEDO

Ing. Agrónoma – Doctora Ciencias-Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

ASESOR

Magister GERARDO ANDRES TORRES RODRÍGUEZ

PROFESOR DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

ASESOR

Ing. JAIME EDUARDO MUÑOZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

POPAYÁN

201

Nota de aceptación

Director _____
Ph.D ANA MILENA CAICEDO

Jurado _____
MSc. GISELLE ZAMBRANO GONZÁLEZ

Jurado _____
MSc. ISABEL BRAVO REALPE

Fecha de sustentación: Popayán, 05 de Marzo de 2012

DEDICATORIA

A tí, quién haz estado conmigo, compartiendo mis pequeños logros, mis sueños desde el inicio de mis primeros pasos, por vivir en la parte más cálida de mi corazón; por ser la caricia más maravillosa de mi vida en los momentos de debilidad y tristeza. Tú, mi compañero, amigo fiel, esa voz interna que me da fuerzas para levantarme y seguir: Gracias Dios por tu amor tan transparente.

A mis padres, Sixto Alberto Orobio y Diola Ruth Mosquera, por enseñarme a luchar, esforzarme cada día y a que pese a las circunstancias dar siempre lo mejor de mí. Gracias por darme una vida llena de la mejor educación, llena de valores y cariño.

A mis hermanos, Julián, Diego, Sixto y Gerardo. Gracias por su apoyo incondicional, por toda una vida de sonrisas, de confianza y de haber tenido una infancia y madurez perfecta a su lado. Siempre agradeceré a Dios por tenerlos a mi lado.

A mi familia, en especial a mi tía Teresita por ser como una segunda madre. Gracias por tu entrega.

A mis compañeros y grandes amigos, Jeisson, Adriana, Edward, Mónica, Paola y Nini. Gracias por esa amistad tan incondicional y desinteresada. Los llevaré siempre en mi corazón.

A todas las personas que con sus consejos me permitieron corregir mis errores y crecer como persona.

AGRADECIMIENTOS

Al M. Sc. Gerardo Andrés Torres, Director de la Unidad de Microscopía, por su apoyo, tiempo y esfuerzo dedicado a la elaboración del trabajo de grado y a las sugerencias realizadas.

A la Dra. Ana Milena Caicedo, por haberme transmitido sus amplios conocimientos y experiencia con los nematodos, por su paciencia, y acompañamiento en la realización del trabajo de grado.

Muchas Gracias Dr. Jaime Eduardo Muñoz, Director Laboratorio de Biología Molecular y Grupo de Investigación Diversidad Biológica UNAL- Sede Palmira, por la ayuda brindada y su nobleza para conmigo.

A Nancy Cardozo, productora de insumos biológicos del laboratorio de Bioecológicos por el suministro de parte del material biológico para la realización del presente trabajo.

A los compañeros Andrés Posso y Efrén M., por tantas horas robadas de su tiempo, sus palabras amigables y su apoyo incondicional.

Al Grupo de Investigación en Diversidad Biológica, UNAL- Sede Palmira Valle, por su hospitalidad.

A la Vicerrectoría de Investigaciones por la financiación del Proyecto con código: ID 2725.

A la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca y al laboratorio de Microscopia Electrónica Escuela de Materiales Universidad del Valle por su acompañamiento para la realización, procesamiento y toma de fotografías.

A los profesores del departamento de Biología, por su colaboración y ayuda.

A mis compañeros con los cuales tuve la fortuna de compartir los mejores momentos de nuestra carrera, especialmente Yaqueline, Viviana y Paula.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. ANTECEDENTES.....	5
5. OBJETIVOS	7
5.1. GENERAL	7
5.2. ESPECÍFICOS	7
6. REVISIÓN DE LITERATURA	8
6.1 GENERALIDADES DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEPs)	8
6.1.1 Taxonomía.....	8
6.1.2 Morfología.....	10
6.1.3 Biología.....	11
6.1.4 Distribución.....	14
6.2 FACTORES QUE GENERAN CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL EN LOS NEPs	14
6.3 UTILIZACIÓN DE LOS NEPs COMO ALTERNATIVA EN EL CONTROL BIOLÓGICO	15
6. 4 CONSIDERACIONES GENERALES DEL CULTIVO DE CHONTADURO	16
6. 5 CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS EN NEPs	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 UBICACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL	18
7.2 MATERIAL BIOLÓGICO	18
7.3 FASE DE LABORATORIO	19
7.3.1 Multiplicación de Nematodos	19
7.3.2 Cuantificación de Nematodos	21
7.4. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	22
7.4.1 Preparación de muestras para Microscopía Óptica	23

7.4.2 Preparaciones permanentes en Adultos (Poinar, 1975)	23
7.4.3 Preparaciones permanentes de IJs (M. R. de Seinhorst 1959)	24
7.4.4 Preparaciones para Microscopia Electrónica de Barrido	24
7.5 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMETRÍA DE LOS AISLAMIENTOS	24
7.5.1 Caracteres Morfológicos Considerados en las Formas Infeccivas	26
7.5.2 Caracteres Morfológicos en los Machos	26
7.5.3 Caracteres Morfológicos Considerados las Hembras	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1 CICLO BIOLÓGICO DE LOS AISLAMIENTOS	28
8.2 DESCRIPCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	32
8.2.1 Aislamiento UNPS12	32
8.2.1.1 Machos de Primera y Segunda Generación	33
8.2.1.2 Infeccivos Juveniles (IJs)	35
8.2.1.3 Hembras de Primera y Segunda Generación)	37
8.2.2 Aislamiento UNPS13	40
8.2.2.1 Machos de Primera y Segunda Generación	41
8.2.2.2 Infeccivos Juveniles (IJs)	42
8.2.2.3 Hembras de Primera y Segunda Generación)	44
8.2.3 Aislamiento UNPS14	48
8.2.3.1 Machos de Primera y Segunda Generación	48
8.2.3.2 Infeccivos Juveniles (IJs)	51
8.2.3.3 Hembras de Primera y Segunda Generación)	53
8.2.4 Aislamiento UNPS15	56
8.2.4.1 Machos de Primera y Segunda Generación	56
8.2.4.2 Infeccivos Juveniles (IJs)	59
8.2.4.3 Hembras de Primera y Segunda Generación)	61
9. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLAMIENTOS	66
10. CONCLUSIONES	69
LITERATURA CITADA	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Morfología de la espícula y del gubernáculo (Nguyen, 1993)	1
Figura 2 Ciclo de los nematodos entomopatógenos. A: Localización y penetración de las formas juveniles infectivas en el hospedador. B: Muerte del hospedero. C: Primera generación de adultos y sucesión de generaciones. D: Salida de las nuevas formas infectivas (Morton, 2009).	2
Figura 3 Ubicación geográfica de los tres corregimientos de estudio, Cisneros, Córdoba y Llano Bajo, pertenecientes al Municipio de Buenaventura - departamento del Valle del Cauca.	19
Figura 4 Larvas desinfectadas en hipoclorito. B. larvas <i>D. saccharalis</i> en su último estadio. C-D. Larvas inoculadas con nematodos entomopatógenos.	20
Figura 5 Trampa de White utilizada para la recuperación de IJs. Las formas infectivas fueron almacenadas en tubos falcón de 50 mL.	21
Figura 6 Larva parasitada con NEPs. Los nematodos fueron separados por sexo para el tratamiento de microscopía óptica.	22
Figura 7 Soluciones utilizadas para el tratamiento de placas permanente. Nematodos depositados en cajas Petri para microscopía óptica.	23
Figura 8 Fotomicrografía de la región cefálica de un macho, donde se observa la medida de la longitud del estoma y la distancia del estoma al poro excretor.	25
Figura 9 Fotomicrografía de la región caudal de un macho, donde se observa la medida del mucrón	26
Figura 10 Fotomicrografías del segundo estado juvenil (IJ2). A. Longitud total. B. Región caudal, con cola filiforme atenuada.	30
Figura 11 Fotomicrografía del Tercer Estado juvenil no Infectivo, donde se observa claramente un lumen intestinal prominente, esófago	30

ancho y cola aguda.

- Figura 12** Fotomicrografías estado juvenil preadulto -IJ4 (Hembra). A. Región Cefálica. B. Primordios Conspicuos de la vulva. 31
- Figura 13** Fotomicrografías estado juvenil preadulto -IJ4 Macho. A. Región Cefálica IJ4 Macho. B. Longitud Total IJ4. C. Región Cefálica Adulto Macho. 31
- Figura 14** Larvas *D. saccharalis* parasitadas con NEPs donde se observa su coloración amarillo ocre. 32
- Figura 15** Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS12. A. Macho de 1ra Generación (10x). B. Macho de 2da Generación (10x) C. Región Cefálica (40x) D. Región Caudal (40x). RC: Región Cefálica. RCD: Región Caudal. LRT: Reflexión del Testículo. BB: Base del Bulbo. AN: Anillo Nervioso. P: Poro Excretor. MB: Manubrium. ES: Espícula. GB: Gubernáculo. LC: Cola. 34
- Figura 16** Fotomicrografías Aislamiento UNPS12. A. Espícula (100x). B Gubernáculo (100x). LM: Lámina. VL: Velo. CN: Cuneus. 34
- Figura 17** Micrografías electrónicas de Barrido, NEPs aislamiento UNPS12. A. Macho de 1ra Generación región caudal, donde se observan, las papilas genitales y precloacales. B. Región Cefálica, apilas labiales, estoma abierto. C. Espícula. Pv: Papila ventral. Pp: Papilas precloacales. 35
- Figura 18** Fotomicrografía de IJs, aislamiento UNPS12. A. Longitud total IJs (10x). B. Región cefálica (100x) C. Región Caudal (40x). RC: Región Cefálica. LC. Cola. AN: Anillo Nervioso. 0BB: Base del Bulbo. P: Poro Excretor. AN: Ano. FS: Fasmidio. 36
- Figura 19** Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS12. A. Región Cefálica con papilas prolongadas B. Cola. C-D. Surcos laterales. Af: Anfidios. Lc: Cola. Bs: Bandas laterales. 36
- Figura 20** Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS12. A. Hembra adulta H1G (4x). B. Hembra adulta H2G (4x) C. Región cefálica (40X). E: Estoma. LC: Cola. RC: Región Cefálica. P: Poro. AN: Anillo Nervioso. BB: Base del Bulbo. VL: Vulva. 37

Figura 21	Fotomicrografías de la Vulva antes y después del apareamiento, aislamiento UNPS12. A. Tapón vulvar. Vulva (40x) y B. Vulva con labios prolongados, IJs en desarrollo.	21
Figura 22	Fotomicrografías, Machos del aislamiento UNPS13. A. Macho, longitud total (10x). B. Macho, región cefálica (40x) C-D. Región Caudal (40x). LRT: Reflexión del Testículo. M: Mucrón.	41
Figura 23	Fotomicrografías de espículas y gubernáculo de UNPS13. A. Espículas con manubrio redondo (100x). B. Posición del gubernáculo y espículas (100x). Gb: Gubernáculo. Es: Espículas.	41
Figura 24	Micrografías electrónicas de Barrido, NEPs aislamiento UNPS13. A. Región Cefálica, macho de 1ra Generación, donde se observa el poro excretor. B-C. Región caudal. C. Espícula, con lámina gruesa. P: Poro excretor.	42
Figura 25	Fotomicrografías, IJs del aislamiento UNPS13. A. Región cefálica (100x). B. Región Caudal (100x).	43
Figura 26	Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS13. A. Longitud total. B. Región Caudal, estriaciones laterales. C. Anfidios. D. Estructuras a manera de cuernos. Af: Anfidios. C. Estructuras a manera de cuernos.	43
Figura 27	Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS13. A. Fasmidio situado en la mitad del cuerpo. B. Ano cerrado, cola filiforme. C-D. Bandas laterales.	44
Figura 28	Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS13. A. Hembras de primera generación, (4x). B. Hembra de segunda generación (10x).	45
Figura 29	Fotomicrografías Región cefálica Hembras del aislamiento UNPS13. A. Región cefálica, normal en desarrollo (40x). B. Región Cefálica en Endotoquia Matricida (40x).	45
Figura 30	Fotomicrografías Región caudal Hembras del aislamiento UNPS13. A. Cola H2G, conoide con poca protuberancia postanal (40x). B. Cola H1G con mucrón al final. Protuberancia postanal (40x).	46

Figura 31	Fotomicrografía de la vulva, aislamiento UNPS13. Sin epitigma, labios cortos.	46
Figura 32	Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS14. A. Macho, longitud total (10x). B. Macho, región cefálica (40x) C-D. Región Caudal (40x) (100x).	49
Figura 33	Fotomicrografías espícula y gubernáculo, aislamiento UNPS14. A. Espícula (100x). B. Gubernáculo, Cuneus en forma de Y (100x).	50
Figura 34	Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS14. A. Región cefálica y estriaciones laterales a lo largo del cuerpo. B. Estoma abierto, con 6 papilas labiales y 4 cefálicas. C-D. Región caudal. M: Mucrón. N: Ano. Pp: papilas precloacales. Es: Espículas.	50
Figura 35	Micrografías electrónicas de Barrido de espícula y gubernáculo, aislamiento UNPS14. A. Espícula. B. Gubernáculo.	51
Figura 36	Fotomicrografías de IJs, aislamiento UNPS12. A. Longitud total IJs (10x). B. Región cefálica (100x) C. Región Caudal (100x). AN: Anillo Nervioso. Bb: Base del Bulbo. P: Poro Excretor.	52
Figura 37	Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS14. A-B. Región Cefálica B. Región caudal. C. Región media, estriaciones laterales. Fs: Fasmido.	52
Figura 38	Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS14. A. Hembra adulta H1G (4x). B. Hembra adulta H2G (10x) C. Región cefálica H1G (40X). C. Región Cefálica H2G (40x).	53
Figura 39	Fotomicrografías de región caudal y vulva, hembras aislamiento UNPS14. A-B. H2G (40x), H1G (40X). C-D. Vulva con epitigma simple (40x).	54
Figura 40	Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS15. A. Región cefálica, M1G y M2G (10x) (40x). C-D. Región Caudal (40x)	57

(100x).

- Figura 41** Fotomicrografías espícula y gubernáculo, UNPS14. A. Espícula (100x). B. Gubernáculo (100x). 58
- Figura 42** Micrografías electrónicas de Barrido de espículas, aislamiento UNPS14. A-B. Espícula con velo casi hasta el extremo distal y manubrio redondo. 59
- Figura 43** Micrografía electrónica de la Región caudal, Macho aislamiento UNPS14. 59
- Figura 44** Fotomicrografía de IJs, aislamiento UNPS15. A. Longitud total IJs (10x). B. Región cefálica, donde se observa el poro excretor y dos fasmidos posterior a este (100x) C. Región Caudal (40x). Poro Excretor. FS: Fasmidio. 60
- Figura 45** Micrografías electrónicas de Barrido, aislamiento UNPS15. A - B. Fasmidios posición posterior al anillo nervioso, especie de nervadura en uno de estos. C. Poro excretor. D. Región caudal, con fasmidos por debajo del ano. P: Poro excretor. Pc: Papila cefálica. 60
- Figura 46** Micrografía electrónica de la región media, IJ aislamiento UNPS15, donde se observa claramente patrón lateral. Bs: Bandas laterales. 61
- Figura 47** Fotomicrografías hembras del aislamiento UNPS15. A-B. Longitud total H1G y H2G (4x). 62
- Figura 48** Fotomicrografías región cefálica de hembras del aislamiento UNPS15. A. H1G (40x). B. H2G (40x). 62
- Figura 49** Fotomicrografías de región caudal, hembras aislamiento UNPS15. A H1G (40x). B. H1G (40X). 63
- Figura 50** Fotomicrografías de región vulvar, hembras del aislamiento UNPS15. A. Vulva con epitigma simple (40x). B. Vulva muy protuberante con labios de pequeño tamaño. 63

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación de los grandes grupos de nematodos entomopatógenos y algunas de sus especies	8
Tabla 2	Lista de especies pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae ordenadas alfabéticamente junto con los autores y el año de la descripción. Stock y Hunt (2005) y Nguyen y Hunt (2007)	9
Tabla 3	Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS12 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).	38
Tabla 4	Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS13 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).	46
Tabla 5	Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS14 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).	54
Tabla 6	Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS15 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).	63

RESUMEN

Los Nematodos Entomopatógenos (NEPs) son considerados una de las alternativas biológicas más relevantes para el control de insectos-plaga. Se describen morfológica y ultra-estructuralmente las especies de NEPs nativos de la familia Steinernematidae de tres localidades del Municipio de Buenaventura, Valle-Colombia (Córdoba, Llano Bajo y Cisneros), asociadas a cultivo de Chontaduro mediante microscopia de luz (ML) y electrónica de Barrido (MEB) con análisis de variables morfométricas de machos, hembras e infectivos. La identificación de NEPs se realizó en laboratorio y los NEPs se reprodujeron sobre larvas de último estadio de *Diatraea saccharalis*. La ML se realizó mediante inclusión en glicerina de individuos y prefijación, posfijación, secado de punto crítico y cubrimiento con oro para MEB. Las observaciones se realizaron en un JEOL JSM 6490 LV y las evaluaciones morfológicas con el analizador de imágenes Image-Pro plus Media Cybernetics (v.6.3). Las hembras resultaron anfídelficas, con y sin mucrón, vulva situada en la mitad, ovovivíparas, endotoquia matricida, estoma corto y ancho. Machos monórquicos, espículas pares separadas y de tamaño variable, gubernáculo presente, papilas genitales, bursa ausente, cola con mucrón. Infectivos juveniles con poro excretor localizado por delante del anillo nervioso, cola puntiaguda, cutícula con estriaciones longitudinales, boca y ano cerrado, faringe e intestino colapsado. La integración de las técnicas de microscopia empleadas permitió observar similitud en los diferentes caracteres morfológicos de los diferentes aislamientos, pero se observaron diferencias significativas en su morfometría.

Palabras claves: Nematodos, Entomopatógenos, Morfometría, Microscopía Electrónica, Identificación.

SUMMARY

Entomopathogenic Nematodes (EPN) are considered one of the most important biological alternatives for control of insect pests. Described morphological and ultra-structural EPN native species of the family Steinernematidae three different locations in the rural municipality of Buenaventura, Valle Colombia (Córdoba, Llano Bajo, Cisneros), associated with Chontaduro culture, by Light Microscope (ML) and Scanning Electron Microscopy (SEM) with analysis of morphometric variables of males, females and infected. The identification of EPN was determined in the laboratory; in the breeding of EPN were used late-stage larvae of *Diatraea saccharalis*, for ML, inclusion in glycerin of individuals and SEM, prefixation, postfixation, critical point drying and coating with gold. Observation by scanning electron microscope JEOL JSM 6490 LV and morphological assessments with image analyzer Image-Pro Plus Media Cybernetics (V.6.3). Female's anfidelfas, with or without mucro, vulval situated in the middle, ovoviviparous, endotoquia matricide, stoma short and wide. Males monórquicos, espicules separate in pairs of varying size, gubernaculum present, genital papillae, bursa absent, tail with mucro. Infective juvenile excretory pore locate interior to the nerve ring, pointed tail, cuticle with longitudinal striations, closed mouth and anus, pharynx and intestine collapsed. The integration of different microscopy techniques reflect similarities in the morphology of the different strains tested, but significant differences between the sizes of the characters studied.

Keywords: Nematodes, Entomopathogenic, Morphometry, Electron Microscopy, Identification.

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos son los animales multicelulares más numerosos que actualmente viven en la tierra. Una pequeña porción de suelo contiene millares de ellos. Existen libres en el mar, suelos húmedos y aguas continentales, siempre en sitios con algún grado de humedad, especialmente en hábitats en los que hay una intensa descomposición de materia orgánica (Ruppert y Barnes, 1996).

Los nematodos entomopatógenos (NEPs), comprenden el grupo más importante de nematodos parásitos de insectos del orden *Rhabditida* y familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Los principales géneros son *Heterorhabditis* Poinar, *Steinernema* Travassos y *Neosteinernema* Nguyen y Smart, con 10, 43 y una especie identificada respectivamente (Adams, 2006). Estos a su vez, poseen una asociación con una bacteria mutualista del género *Xenorhabdus* para los Steinernematidae y *Photorhabdus* para los Heterorhabditidae, la cual les confiere ventajas en el control de insectos plaga (Boemare, 2002).

Los NEPs poseen características especiales que los convierten en una alternativa importante para el control de insectos-plaga entre las que se destacan, su alto potencial reproductivo, facilidad de producción masiva en condiciones de laboratorio, inocuidad tanto a vertebrados como invertebrados y su fácil aplicación, sin requerir equipos sofisticados y además son compatibles con plaguicidas químicos y biológicos (Caicedo y Bellotti, 1994). Actualmente los esfuerzos se centran en la identificación de nuevas especies o en la evaluación de su potencial patogénico para controlar insectos plaga (Powell y Webster, 2004), especialmente de hábito subterráneo que atacan diferentes cultivos entre ellos el Chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth), el cual es la base económica fundamental de los agricultores, además de que abarca extensas regiones del Pacífico Colombiano.

Por tanto, la importancia de realizar la caracterización morfológica de especies nativas de NEPs aislados de cultivos de importancia agrícola como el chontaduro, implementando el uso de técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido, utilizando además un sistema de análisis de imágenes, con el fin de establecer los parámetros morfométricos.

La caracterización morfológica es básica en la identificación de nuevos aislamientos, cuyo objetivo final es registrar los aislamientos obtenidos a la comunidad científica internacional. Adicionalmente, los estudios biológicos otorgan una gran información en cuanto al uso de los NEPs y su relación con los insectos-plagas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la última década, cultivos como el Chontaduro, base económica fundamental de los agricultores del Bajo Anchicayá, ha venido presentando problemas de limitaciones fitosanitarias generadas por plagas que afectan el follaje y los frutos, lo que ha llevado consigo un aumento excesivo en el control químico por parte de los moradores del lugar. Sin embargo, esta solución aparente solo ha causado a largo plazo, resistencia en algunos insectos, acumulación de residuos tóxicos y en general la degradación del medio (Olaya *et al.*, 2008). Por tanto, surge la necesidad del uso de los nematodos entomopatógenos como herramientas ideales dentro de los planes de manejo integrado de plagas, por su potencial como agentes de control biológico y amabilidad con el medio ambiente (Ebbsa *et al.*, 2008).

Sin embargo, como primera medida, es necesario contar con estudios de identificación, ya que otorgan información amplia en el uso y distribución de estas especies nativas. Además, el incremento en el número de nuevas especies no descritas hasta el momento, ha llevado al establecimiento de un consenso metodológico entre investigadores para asegurar la adecuada identificación de este grupo, mediante el uso combinado de herramientas taxonómicas y moleculares, las cuales se buscan que sean rápidas y precisas (Phan *et al.*, 2003).

En este contexto, con el fin de contribuir en esta problemática se plantea mediante metodologías tradicionales (parámetros morfológicos), acompañado mediante el uso de un sistema de Análisis Digital de Imágenes, con lo que se busca altos niveles de precisión, aportar en:

- ✓ La caracterizar los aislamientos nativos mediante parámetros morfométricos y biológicos.

HIPÓTESIS:

Los NEPs asociados a la especie *Bactris gasipaes* Kunth presentan características morfológicas, morfométricas y biológicas similares a las especies ya identificadas para el género *Steinernema* Travassos.

3. JUSTIFICACIÓN

El interés creciente en la implementación e introducción de NEPs como agentes de bio-control en un sitio particular, ha corroborado la importancia de contar con un conocimiento previo de su ocurrencia y de una apropiada identificación de las especies nativas (Kaya y Stock, 1997).

Colombia no ha sido la excepción en el estudio de estos enemigos naturales, con los cuales se han adelantado investigaciones para el manejo integrado de plagas en cultivos de importancia nacional como café, banano, flores, plátano, palma africana, caña, piña, papa, pastos, maíz, sorgo, yuca, cebolla, espárragos, ornamentales, hortalizas, y cítricos (López *et al.*, 2007). Sin embargo, no es suficiente lo logrado hasta el momento, un número muy reducido de NEPs nativos han sido identificados asociados a las diferentes especies-plaga.

Actualmente se cuenta sólo con cuatro muestreos sistemáticos asociados a especies-plaga en diferentes cultivos, el primero relacionado con *Cyrtoneurus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en cultivos de yuca y cebolla larga (Caicedo y Bellotti, 1994), seguido de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en cultivos de café (López, 2002), luego en *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) (Sáenz, 1998), y finalmente el complejo de picudos de la palma de chontaduro *Palmelampus heinrichi*, (Coleoptera: Curculionidae) barrenador de frutos, en un estudio para conocer la diversidad de los microorganismos asociados (Olaya *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos han mostrado el hallazgo de nuevas especies de nematodos asociados a cada una de los cultivos mencionados, pero de los diferentes aislamientos obtenidos, se han identificado sólo dos especies, *Steinernema feltiae*, cepa Villa pinzón asociada a *Tecia solanivora* y la nueva especie *Steinernema colombiense* asociada a *Hypothenemus hampei*. Muchos aislamientos aún se encuentran sin identificación. Por lo tanto, es necesario adelantar la identificación de las mismas.

4. ANTECEDENTES

Los NEPs están ubicados jerárquicamente en grupos taxonómicos con relación a sus relaciones morfológicas y biológicas y filogenéticas, según lo establecido con el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Tabla 1). Durante la última década se han identificado diversas especies de NEPs asociados a distintos hábitats u hospederos a nivel mundial mediante estudios de caracterización morfológica (Tabla 2).

En Brasil, estudios realizados por Dolinski y colaboradores (2008) en la caracterización morfológica y molecular de especies del género *Heterorhabditis* de la selva tropical de Brasil mediante análisis morfométricos y moleculares con la amplificación y secuenciación de ITS, identificaron dos especies, de 19 aislamientos obtenidos, *H. indica* y *H. baujardi*

En Colombia, López-Nuñez *et al.* (2008) registraron una nueva especie como *Steinernema colombiense*. Igualmente, se destacan los trabajos realizados por Caicedo y Bellotti (1996), Ortiz (1994) y Garzón *et al.* (1996), con especies del género *Steinernema*, para el control de algunas plagas de interés nacional. Así como la descripción del ciclo de vida del nemátodo nativo *S. feltiae*, además de la descripción de los estados juveniles, influencia de la temperatura en el ciclo de vida y la relación de sexos (Saéñz *et al.*, 2000). López y colaboradores (2007), realizaron un estudio sobre diversidad y relaciones filogenéticas de los NEPs *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* en la región central andina de Colombia, con el cual caracterizaron morfológica y molecularmente especies de los género *Steinernema* y *Heterorhabditis*.

De igual forma, se han evaluado algunas cepas introducidas de NEPs. Caicedo (1996) evaluó la especie *S. carpocapsae* para el control del chinche *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae), el cual es un insecto polífago de hábito subterráneo, que se alimenta directamente de las raíces de plantas como yuca, maíz, maní, cebolla y espárragos, las cuales son de importancia económica. Landázabal *et al.* (1973) evaluaron la especie *S. feltiae* sobre el cogollero del maíz *Agrotis ipsilon*. Aislamientos nativos de NEPs han mostrado resultados promisorios para el control de diversas especies-plaga, por ejemplo López y Briscoe (1999) evaluó la especie *Steinernema* sp. en la broca del café *Hypotenemus hampei* con un

porcentaje de control superior al 80%. De igual manera López (1997) probó las especies *H. bacteriophora* y *S. glaseri* evaluando su efectividad sobre larvas de *H. hampei* con un porcentaje de mortalidad del 88% y 84.8%. En CIAT se reporta aislamientos de NEPs asociados a *C. bergi* Froeschner (Caicedo *et al.*, 2003).

Cabe denotar, que los NEPs han sido utilizados en programas de control biológico, entre los que se encuentran los países de Estados Unidos, China, Alemania, donde se han realizado estudios sobre especies de familia *Steinernematidae*, hasta la obtención de un producto comercial para el manejo especialmente de insectos-plaga. La primera utilización de NEPs se realizó a mediados de los años 30, con el uso de *S. glaseri* para el control del coleóptero escarabeido *Popillia japonica*, en Nueva Jersey y Maryland (EE.UU.) (Glaser, 1932; Glaser y Ferrell, 1935). Pero no fue hasta los años 70s, cuando algunos plaguicidas fueron prohibidos por la EPA (Environmental Protection Agency, de EE.UU.), que aumentó el interés por el estudio de los NEPs como agentes de control biológico. Sin embargo, actualmente, a pesar del gran número de especies de NEPs que se conocen, la posibilidad de comercialización se ha limitado a unas pocas especies (Grewal y Georgis, 1999; Shapiron-Ilan *et al.*, 2002), como es el caso de Europa y Estados Unidos, donde se comercializan cinco especies de steinernemátidos que son *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. riobrave*, *S. krausei* y *S. scapterisci*, siendo los dos primeros los más utilizados comercialmente.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Contribuir a la caracterización morfológica y ultra-estructural de las especies de NEPs de la familia Steinernematidae asociadas a cultivos de Chontaduro.

5.2 ESPECÍFICOS

1. Describir el ciclo biológico de cada una de las especies de NEPs nativas de chontaduro sobre larvas de *Diatraea saccharalis*.
2. Realizar una descripción morfológica de machos, hembras e infectivos de cada una de las especies de NEPs nativas asociadas a chontaduro mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.
3. Determinar las principales características morfológicas y morfométricas de las especies nativas de NEPs asociadas a chontaduro, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.

6. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1 GENERALIDADES DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEPs)

6.1.1 Taxonomía

Los nematodos se encuentran ubicados en el Phylum Nematoda, el cual se subdivide en las clases Secernentea y Adenophorea (Poinar, 1979). Los nematodos entomopatógenos que tienen posibilidades de control se encuentran en cuatro órdenes de importancia Rhabditida, Mermitida, Tylenchida y Aphelenchida (Smart y Nguyen, 1994). Sin embargo, la clasificación de los nematodos en general (Tabla 1), especialmente en los grupos de nematodos parásitos y/o asociados a insectos está en continua revisión, particularmente a nivel de familia y género con frecuentes cambios en las denominaciones de género y especie. Esto no solo se debe a las revisiones taxonómicas a nivel morfológico, sino también a la incorporación de técnicas moleculares como herramientas para la identificación de nematodos (Stock, 1998; Del Pozo, 2000).

Tabla 1. Clasificación de los grandes grupos de nematodos entomopatógenos, y algunas de sus especies.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	ESPECIE
Secernentea (Aphasmida)	Rhabditida	Rhabditidae	<i>Rhabditis insectivora</i>
		Steinernematidae	<i>Steinernema carpocpsae</i>
		Heterorhabditidae	<i>Heterorhabditis</i>
		Oxyuridae	<i>bacteriophora</i>
	Diplogasterida	Diplogasteridae	<i>Eudiplogaster aphodii</i>
	Tylenchida	Allantonematidae	<i>Deladenus siricidicola</i>
		Sphaerulariidae	<i>Sphaerularia bombi</i>
	Aphalenchida	Aphelenchorididae	<i>Parasitaphelenchus sp.</i>
		Entaphelenchidae	<i>Entaphelenchus sp.</i>
	Adenophorea (Phasmida)	Stichosomida	Tetradonematidae

Fuente: Fernández y Arteaga (1995).

Dentro del orden Rhabditida se encuentra la mayoría de nematodos de vida libre incluyendo a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, parásitos facultativos de insectos (Smart y Nguyen, 1994). Actualmente la familia Steinernematidae comprende dos géneros; *Steinernema* Travassos, 1927 (Hominick *et al.*, 1997) con 32 especies, el 60% han sido descubiertas en la última década y *Neosteinernema* Nguyen y Smart 1994 (Nguyen y Smart, 1994) con una sola especie. La familia Heterorhabditidae lo comprende el género *Heterorhabditis* Poinar con 10 especies, 75% de estas también han sido descubiertas en la última década. En la Tabla 2, se muestra las especies de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* descritas hasta de acuerdo a Stock y Hunt (2005) y Nguyen y Hunt (2007).

Tabla 2. Lista de especies pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae ordenadas alfabéticamente junto con los autores y el año de la descripción. Stock y Hunt (2005) y Nguyen y Hunt (2007).

<p style="text-align: center;">Familia Steinernematidae género <i>Steinernema</i> Travassos, 1997</p>	<p><i>S. abbasi</i> Elewad, Ahmad y Reid, 1997; <i>S. aciari</i> Qiu, Yan, Zhou, Nguyen y Pang, 2005; <i>S. affine</i> Bovien, 1937; Wouts <i>et al.</i>, 1982; <i>S. akhursti</i> Qiu <i>et al.</i>, 2005; <i>S. anatoliense</i> Hazir, Stock y Keskin, 2003; <i>S. anomalii</i> Kozodor, 1982; Curran, 1989; <i>S. apuliae</i> Triggiani, Mrácek % Reid, 2003; <i>S. arenarum</i> Artyukhonovsky, 1967; Wouts, <i>et al.</i>, 1982; <i>S. ashiuense</i> Phan <i>et al.</i>, 2006; <i>S. asiaticum</i> Anis <i>et al.</i>, 2002; <i>S. backanense</i> Phan <i>et al.</i>, 2006; <i>S. bedding</i> Qiu <i>et al.</i>, 2005; <i>S. bicornutum</i> Tallosi, Peters y Ehlers, 1995; <i>S. carpocapsae</i> Weiser, 1955; Wouts <i>et al.</i> 1982; <i>S. caudatum</i> Xu, Wang y Li, 1991; <i>S. ceratophorum</i> Jiam, Reid y Hunt, 1997; <i>S. cholashanense</i> Nguyen <i>et al.</i>, 2008; <i>S. colombiense</i> Lopéz-Núñez <i>et al.</i>, 2008; <i>S. costaricense</i> Uribe <i>et al.</i>, 2007; <i>S. cubanum</i> Mracek, Hernandez y Boemare, 1994; <i>S. cumgareense</i> Phan <i>et al.</i>, 2006; <i>S. diaprepesi</i> Nguyen y Duncan 2002; <i>S. eapokense</i> Phan <i>et al.</i>, 2006; <i>S. feltiae</i> Filipjev, 1934; Wouts <i>et al.</i> 1982; <i>S. glaseri</i> Steiner, 1929; Wouts <i>et al.</i>, 1982; <i>S. guangdongense</i> Qiu <i>et al.</i>, 2004; <i>S. hebeiense</i> Chen <i>et al.</i>, 2006; <i>S. hermaphroditum</i> Stock <i>et al.</i>, 2004; <i>S. ichnusae</i> Tarasco <i>et al.</i>, 2008; <i>S. intermedium</i> Poinar, 1985; Mamiya, 1988; <i>S. jollieti</i> Spiridonov <i>et al.</i>, 2004; <i>S. karri</i> Waturu, Hunt y Reid, 1997; <i>S. khoisanae</i> Nguyen <i>et al.</i>, 2006; <i>S. kraussei</i> Steiner, 1923; Travassos, 1927; <i>S. kushidai</i> Mamiya, 1988; <i>S. leizhouense</i> Nguyen y Moens, 2001; <i>S. litorale</i> Yoshida, 2005; <i>S. loci</i> Phan, Nguyen y Monees, 2001; <i>S. longicaudum</i> Shen y Wang, 1992; <i>S. monticolum</i> Stock, Choo y Kaya, 1992; <i>S. neocurtillae</i> Nguyen y Smart, 1992; <i>S. oregonense</i> Liu y Berry, 1996; <i>S. pakiistanense</i> Shahina <i>et al.</i>, 2001; <i>S. puertoricense</i> Romin y Figueroa, 1994; <i>S. puntauense</i> Uribe <i>et al.</i>, 2007; <i>S. rarum</i> De Doucet, 1986; Mamiya, 1988; <i>S. riobrave</i> cabanillas, Poinar y</p>
--	---

	Raulston, 1994; <i>S. ritteri</i> Doucet y Doucet, 1990; <i>S. robustispiculum</i> Phan <i>et al.</i> , 2005; <i>S. sangi</i> Phan <i>et al.</i> , 2001; <i>S. sasonense</i> Phan <i>et al.</i> , 2006; <i>S. scapterisci</i> Nguyen y Smart, 1990; <i>S. scarabei</i> Stock y Koppenhofer, 2003; <i>S. siamkayai</i> Doucet y Doucet, 1990; <i>S. sichuanense</i> Mráček <i>et al.</i> , 2006; <i>S. silvaticum</i> Sturhan, 2005; <i>S. tami</i> Luc, Nguyen, Reid y Spiridonov, 2000; <i>S. texanum</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2007; <i>S. thanhi</i> Phan. Nguyen y Moens, 2001; <i>S. thermophilum</i> Gangula y Singh, 2000; <i>S. websteri</i> Cutier y Stock, 2003; <i>S. weiseri</i> Mráček <i>et al.</i> , 2003; <i>S. yirgalemense</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2004.
Familia Heterorhabditidae género <i>Heterorhabditis</i> Poinar, 1976	<i>H. amazonensis</i> Andaló <i>et al.</i> , 2007; <i>H. argentinensis</i> Stock, 1993; <i>H. bacteriophora</i> Poinar, 1976; <i>H. bajardi</i> Phan <i>et al.</i> , 2003; <i>H. brevicaudis</i> Liu, 1994; <i>H. downesi</i> Stock <i>et al.</i> , 2002; <i>H. geordiana</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2008; <i>H. floridensis</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2002; <i>H. hawaiiensis</i> (Gardner <i>et al.</i> , 1994); <i>H. indica</i> Poinar <i>et al.</i> , 1992; <i>H. marelatus</i> Liu, 1996; <i>H. megidis</i> Poinar <i>et al.</i> , 1987; <i>H. mexicana</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2004; <i>H. poinari</i> Kakulia y Mikaia, 1997; <i>H. safricana</i> Malan <i>et al.</i> , 2008; <i>H. taysearae</i> Shamseldean <i>et al.</i> , 1996; <i>H. zealandica</i> Poinar, 1990
Género <i>Neosteinerema</i>	<i>N. longicurvicauda</i> Nguyen y Smart, 1994.

6.1.2 Morfología

Los nematodos entomopatógenos son animales no segmentados, con sistema excretorio, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero carentes de sistema circulatorio y respiratorio. La región anterior del género *Steinernema* y *Heterorhabditis*, por lo general es redondeada, con papilas labiales, anfidios, estoma colapsado, esófago rhabditoide con el metacarpus ligeramente hinchado, istmo estrecho rodeado por el anillo nervioso, y bulbo basal alargado con una válvula cardíaca reducida. Los adultos presentan generaciones anfimícticas en *Steinernema* y hermafroditas para *Heterorhabditis* en la primera generación de adultos. Estos se hallan únicamente en el interior de los cadáveres de los insectos que parasitan, no presentan estilete y tienen la cutícula lisa. Su longitud parte de 1 a 8 mm, mientras que la longitud de los juveniles infectivos (IJs) va de un rango de 440 -1500 µm (Baker y Capinera, 1997). Muchos son más o menos cilíndricos en toda la longitud del cuerpo y a menudo son llamados gusanos.

El tracto alimenticio consta de una boca seguida de una cavidad bucal o estoma, esófago, intestino, recto y ano (Poinar, 1979).

En el caso del sistema reproductivo femenino para Steinernematidae y Heterorhabditidae, presentan uno o dos ovarios, vulva localizada ventralmente cerca de la mitad del cuerpo o posteriormente (Kaya y Stock, 1997) a veces sobre una protuberancia con o sin epitigma. Son además, ovovivíparas con juveniles infectivos desarrollados en estado infectivo antes de emerger del cuerpo de la hembra. El adulto masculino posee un sistema que se inicia ventralmente desde el recto formando la cloaca, testículo único retroflexo, con estructuras queratinizadas pares y separadas denominadas espículas (Fig. 1), las cuales son órganos genitales accesorios de penetración ubicadas en el extremo de la cola, su función es dilatar la vulva de las hembras para facilitar el acoplamiento. Presentan también una estructura llamada gubernáculo, de tamaño, a veces igual al de la espícula, es el encargado de guiar las espículas; bursa ausente, punta de la cola redondeada, con o sin mucrón. Una papila simple y 10 a 14 pares de papilas genitales presentes junto con 7 -10 pares de papilas precloacales.

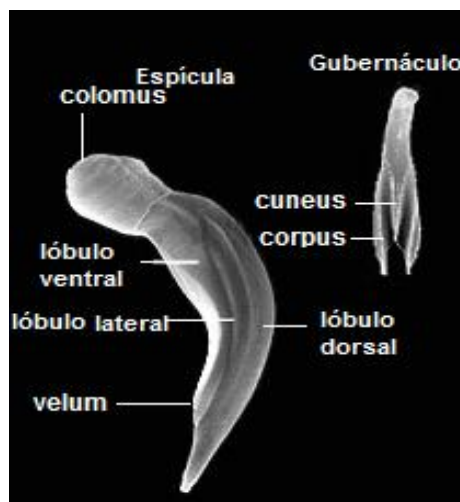


Figura 1. Morfología de la espícula y del gubernáculo (Nguyen, 1993).

Los juveniles infectivos se caracterizan por presentar estoma colapsado, cuerpo alargado, a menudo manteniendo la cutícula del segundo estado juvenil. Campo laterales presentes, con 4 a 9 surcos y de 3 a 8 protuberancias lisas. Presentan también boca y ano cerrado, con esófago e intestino reducido, el poro excretor visible, anterior al anillo nervioso, con fasmidos situados en la zona media del extremo caudal, pudiendo ser prominentes, poco o no observables, cola conoide o filiforme.

6.1.3 Biología

El ciclo de vida de los nematodos de la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae es simple; consta de huevo, cuatro estados juveniles, separados por mudas, y adultos (Woodring y Kaya 1988; Nguyen y Smart, 1992). El tercer estado juvenil larva “dauer” (J3 o IJ) conserva la cutícula del estadio anterior (J2) el cual les confiere las características de resistencia a las condiciones ambientales adversas que se ve expuesto al salir en búsqueda por un nuevo hospedero. Por tanto, el J3 es el único que vive fuera del insecto y es el responsable de la localización e infección de los insectos hospedadores (Kaya y Gaugler, 1993).

Las formas infectivas juveniles conservan células de la bacteria simbiote en su interior, formando lo que se conoce como complejo nemátodo-bacteria, durante este periodo tiene la boca y el ano cerrados y no se alimentan. Los IJs del género *Steinernema* llevan células de la bacteria simbiote en una vesícula intestinal especializada (Bird y Akhurst, 1983; Forst y Clarke, 2002) y los *Heterorhabditis* a lo largo de todo el intestino. Después de localizar el hospedador, las formas infectivas juveniles penetran en él a través de aberturas naturales (boca, ano y espiráculos).

Cuando los infectivos juveniles, llegan al hemocele liberan la bacteria simbiote, *Xenorhabdus* o *Photorhabdus* por defecación (Wouts, 1991; Martens *et al.*, 2003). La bacteria se multiplica rápidamente, libera endo- y exotoxinas, causando la muerte del insecto por septicemia en 24-72 horas (Poinar, 1990). También los nematodos producen sustancias tóxicas contra el insecto, que induce toxicogénesis (Boemare *et al.*, 1982) y producen un factor inmunodepresivo que actúa contra los péptidos antimicrobianos generados por los insectos (Götz *et al.*, 1981).

La bacteria permite el crecimiento y la reproducción del nematodo al suministrarle alimento y produce agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento de otros organismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos (Koppenhofer, 2007). Los nemátodos se alimentan de la bacteria, se desarrollan y dan lugar a una o más generaciones, dependiendo del tamaño del hospedero. Cuando se agotan los recursos aparecen las nuevas formas infectivas, incorporan la bacteria simbiote en su tracto digestivo y emergen del cadáver del insecto (Adams y Nguyen, 2002) para buscar un nuevo hospedero (Kaya y Gaugler 1993) (Fig. 2).

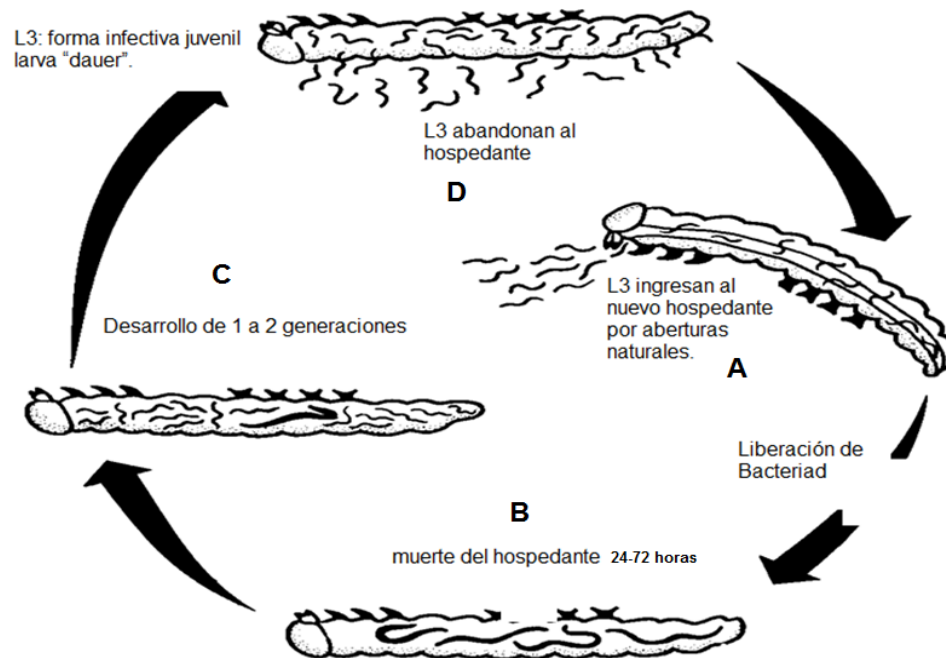


Figura 2. Ciclo de los nematodos entomopatógenos. **A:** Localización y penetración de las formas juveniles infectivas en el hospedador. **B:** Muerte del hospedero. **C:** Primera generación de adultos y sucesión de generaciones. **D:** Salida de las nuevas formas infectivas (Morton, 2009).

La infección por nemátodos entomopatógenos causa un cambio de color en los insectos producido por la bacteria asociada. Generalmente los insectos parasitados por steinermátidos adquieren una coloración café-marrón, que va desde el ocre a casi negro (Kaya, 1993).

Todas las generaciones de los nemátodos de la familia Steinermatidae son anfimícticas (Poinar, 1990) a excepción de una especie, *S. hermaphroditum*, con individuos hermafroditas en la primera generación (Stock *et al.*, 2004). Sin embargo, para la familia Heterorhabditidae las generaciones son inicialmente hermafroditas y luego pasan hacer anfimícticas. Presentan, además nemátodos entomopatógenos ovovivíparas. Inicialmente los huevos se ponen en el medio, pero muchos casos eclosionan dentro del útero de la hembra desarrollando formas juveniles que se alimentan de los tejidos maternos. Este proceso se conoce como endotoquia matricida (Wang y Bedding, 1998; Johnigk y Ehlers, 1999), y parece ser una adaptación ecológica para asegurar la producción y la supervivencia de los NEPs cuando el desarrollo de los nematodos se ve afectado por agentes biológicos o factores no biológicos (Baliadi, 2004).

6.1.4 Distribución

Los nemátodos pueden ser colectados de insectos infectados y del suelo, algunas especies de nemátodos como *S. carpocapsae* y *S. feltiae* están distribuidos en las regiones de clima templado, *H. bacteriophora* es común en regiones con climas continentales y mediterráneos y *H. indica* puede encontrarse en climas tropicales y subtropicales.

Los estados infectivos pueden ser encontrados en el suelo hasta 90 cm tanto en dirección vertical como horizontal con respecto a las raíces de las plantas. Esta distribución cruzada les permite a los NEPs la búsqueda de los insectos. Los factores que influyen en la movilidad de los IJs son la humedad, la temperatura y la textura del suelo, de los cuales el más crítico es la humedad porque en este estado de desarrollo ellos necesitan una película de agua en los espacios intersticiales del suelo para facilitar su movimiento (Koppenhöfer *et al.*, 1995).

6.2 FACTORES QUE GENERAN CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL EN LOS NEPs

Los nemátodos entomopatógenos difieren en eficacia, debido a varios factores, como son los abióticos (como textura y humedad del suelo, temperatura, aireación, exudados de las raíces de las plantas, etc.) y bióticos (como la densidad de los hospedadores, tamaño del hospedador, competencia inter-e intra-específica, enemigos naturales, etc.) también afectan la eficacia de los nemátodos (Zervos *et al.*, 1991, Koppenhöfer *et al.*, 1995; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Ebssa *et al.*, 2004). La capacidad de supervivencia en el medio externo es un aspecto íntimamente relacionado con la eficacia. La supervivencia de las formas infectivas esta también determinada por la capacidad de superar condiciones de stress ambiental, tales como:

- ✓ **bajas y altas temperaturas**
- ✓ **desección**
- ✓ **radiación ultravioleta**
- ✓ **baja disponibilidad de oxígeno**
- ✓ **Plaguicidas**

Los steinernemátidos son capaces de sobrevivir a la exposición de diferentes productos fitosanitarios (Hara y Kaya, 1982; Rovesti *et al.*, 1988; Rovesti y Deseö, 1991; Palomo y García-del-Pino 2000; García-del-Pino y Jové, 2005). Sin embargo las formas infectivas son muy susceptibles a nematicidas que se encuentran en los cultivos agrícolas (Rovesti y Deseö 1991).

Cabe notar, que los nematodos entomopatógenos tienen enemigos naturales, que los hace susceptibles a la infección por microorganismos y a la depredación. Entre sus enemigos se encuentran los nematófagos, ácaros, hormigas o isópodos (Kaya, 2002).

6.3 UTILIZACIÓN DE LOS NEPs COMO ALTERNATIVA EN EL CONTROL BIOLÓGICO

La creciente preocupación por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos inorgánicos, orgánicos o de síntesis en la lucha contra insectos de interés agrícola, forestal, y debido principalmente a las aparición de razas de insectos resistentes, la acumulación de residuos tóxicos y en general la degradación del medio ambiente, ha impulsado a la búsqueda de métodos alternativos para el control de insectos plaga.

En este contexto, se encuentra la utilización de los nematodos entomopatógenos como componentes ideales en programas de manejo integrado de plagas (Lacey y Goettel, 1995). Presentan una combinación de características intermedias entre los depredadores, parásitos y los patógenos de insectos, controlan de forma efectiva una gran variedad de plagas de insectos que causan importantes daños económicos (Shapiro-Ilan, 2004; Grewal *et al.*, 2005). Dentro de las características se encuentran, que son seguros para el medio ambiente, fauna y flora (Poinar *et al.*, 1982; Akhurst y Smith, 2002), son fáciles de aplicar mediante simples equipos de pulverización, de irrigación o inyección y son compatibles con plaguicidas químicos y biológicos (Georgis, 1991).

Este interés ha impulsado varias empresas a desarrollar con los nematodos steinernemátidos y heterorhabdítidos insecticidas biológicos, y a su vez, generar disponibilidad comercial de los mismos, creando inmensas oportunidades para ensayar su eficacia con una amplia variedad de insectos que pueden constituir plagas. Existen numerosos trabajos sobre la eficacia de estos contra diversas plagas, cuyos resultados están recopilados por

diversos autores, como Poinar (1986), Begley (1990), Klein (1990) y Georgis y Hague (1991).

La producción de nemátodos se puede realizar in vivo, sobre larvas de insectos (Woodring y Kaya, 1988) o in vitro, en medios sólidos (Bedding, 1998) o líquidos. Actualmente, la producción de estos se realiza a nivel comercial (in vitro), desarrollando cultivos líquidos en grandes biorreactores que permiten producir volúmenes de hasta 80.000 litros (Ehlers, 2005).

6. 4 CONSIDERACIONES GENERALES DEL CULTIVO DE CHONTADURO

El cultivo del chontaduro es la base económica fundamental de los agricultores del Bajo Anchicayá y en extensas regiones del Pacífico Colombiano, también se produce en los Llanos Orientales, y Amazonía. Esta palma es nativa de estas regiones selváticas con régimen climático y edáfico muy limitante para otras especies de la agricultura convencional, requiere relativamente pocas prácticas culturales e insumos para su producción y presenta dos cosechas, la principal en enero y febrero y la "travesía" entre junio y julio, época en que se nutre y dinamiza el cuadro de ingresos de los habitantes de la región, en general miembros de las comunidades negras del Pacífico, económica y socialmente deprimidas.

Este cultivo también es una excelente fuente alimenticia, es considerado como uno de los alimentos tropicales de mayor valor nutritivo, constituyéndose en un importante aporte vegetal a la dieta humana. Actualmente existen dos alternativas de producción para explotar a esta palma: por su fruto, para el cual existen técnicas que permiten su conservación en forma de harinas o la pulpa para consumo directo y la siembra para extracción de "palmito" (Piedrahita y Vélez, 1986).

Recientemente, este cultivo sufre las limitaciones fitosanitarias ocasionadas por plagas del estipe, follaje y frutos que afectan la rentabilidad y propicia la aplicación de control químico por parte de agricultores (Pardo *et al.*, 1996). Con el fin de reconocer y aislar nemátodos entomopatógenos nativos, Olaya *et al.* (2008) realizó un muestreo de suelo en tres localidades del municipio de Buenaventura (Cisneros, Córdoba y Llano Bajo) (Olaya *et al.*, 2008). El 30.83% de las muestras fueron positivas para nemátodos entomopatógenos. Identificándose solo género, *Steinernema* spp., los tres aislamientos causaron 100% de mortalidad a las larvas de *G. mellonella* a las 48 horas. Los resultados obtenidos indican que los nemátodos entomopatógenos del

género *Steinernema* se encuentran distribuidos en diferentes localidades del municipio de Buenaventura. El hallazgo de estos aislamientos nativos abre posibilidades de su evaluación y posterior uso en programas de manejo integrado de las especies de insectos-plaga más limitantes en el cultivo de mayor de importancia económica de la región.

6. 5 CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS EN NEPs

El uso de datos cuantitativos (medidas de caracteres), es importante en un estudio de identificación de NEPs, porque en algunos casos las especies relacionadas no difieren por la presencia o ausencia de una estructura, pero si por su tamaño o proporción; lo que permite mediante un procedimiento estándar la separación de especies (Poinar *et al.*, 1972; Hirschmann, 1985).

Los métodos morfológicos clásicos han sido aplicados para la descripción, identificación y clasificación de NEPs en género y especie. La identificación correcta es esencial para que otros trabajos puedan ser replicados y comparados (Curran, 1993). Con relación a esto Poinar (1993) sugiere algunos caracteres morfológicos y las proporciones para medir infectivos juveniles de especies de *Heterorhabditis*. De igual forma, Nguyen y Smart (1997), recomiendan la siguiente simbología común y abreviaturas usadas en la morfometría de juveniles infectivos y machos, para *Steinernema* y *Heterorhabditis*:

- ✓ **Infectivos juveniles:** 1. LT: longitud del cuerpo, 2. EP: distancia desde el extremo anterior al poro excretor. 3. LC: Longitud de la cola. 4. E: EP/LC. 5. E%: EP/LC*100.
- ✓ **Machos de Primera Generación:** 1. Ls: Longitud del esófago. 2. %D: EP/Ls. 3. Longitud del gubernáculo y la espícula. 4. Índices: EW: EP/longitud del poro excretor. SW: Longitud espícula/ longitud total. GS: Longitud del gubernáculo/ Longitud de la espícula.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UBICACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional – Sede Palmira y en la Unidad de Microscopía de la Universidad del Cauca. La reactivación de los aislamientos y el montaje de placas permanentes se desarrollo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Colombia-Sede Palmira, Los aislamientos de los nematodos y descripción del ciclo se hicieron bajo condiciones de temperatura de 28 °C y humedad relativa del 67 %.

La toma de fotomicrografías se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca, usando un microscopio de luz Nikon Eclipse 80i equipado con DIC (contraste diferencial de interferencia) y un sistema de análisis de imágenes Image-Pro plus Media Cybernetics (v.6.3) para el estudio morfométrico. Las Micrografías Electrónicas de Barrido fueron tomadas en la Escuela de Ingeniería de Materiales, Laboratorio de Microscopía Electrónica - Universidad del Valle.

7.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Los aislamientos de NEPs se colectaron en tres localidades de la zona rural del municipio de Buenaventura - departamento del Valle del Cauca (Cisneros, Córdoba y Llano Bajo) (Fig. 3), en un estudio de reconocimiento de nematodos entomopatógenos realizado por Olaya *et al.* (2008). Las muestras de NEPs fueron codificadas y almacenadas en el laboratorio de la Universidad Nacional – Sede Palmira como:

- ✓ UNIPX12: Estipe de Chontaduro en descomposición. Cisneros
- ✓ UNIPX13: Cisneros
- ✓ UNIPX14: Córdoba
- ✓ UNIPX15: Llano Bajo



Figura 3*. Ubicaciones geográficas de los tres corregimientos de estudio, (a) Cisneros, (b) Córdoba y (c) Llano Bajo, pertenecientes al Municipio de Buenaventura - departamento del Valle del Cauca.

Según Olaya *et al.* (2008), la zona se caracterizó por presentar muchos policultivos, en los que predominaba el de Chontaduro. En la zona de Cisneros se hallaron componentes de chontaduro (*Bractris gasipaes*), plátano (*Musa sp.*), árboles frutales y especies forestales. La finca de Córdoba estuvo compuesta por papachina (*Bolocasia esculenta*), plátano, chontaduro, árbol del pan (*Arthocarpus sp.*) y especies forestales y el área de Llano Bajo presentó una asociación entre chontaduro y borjón (*Borojoa patinoi*). Sin embargo, todos los sitios se caracterizaron por tener un clima de bosque húmedo tropical (Acosta, 1989), temperatura anual de 28°C y altas precipitaciones que alcanzan los 7000 mm al año. En la característica de los suelos muestreados, Cisneros referenció un pH 5.2, una T°C de 26, %M.O 11 y humedad 30%; Córdoba un pH 4.5, T°C de 26, %M.O 39 y humedad 31.4%; Llano Bajo pH 5.5, T°C 28, %M.O 32 y humedad 38%. La textura del suelo para todos los sitios fue arcilloso (Olaya, 2008).

7.3 FASE DE LABORATORIO

7.3.1 Multiplicación de Nematodos

La multiplicación masiva de los NEPs (Fig. 4), se desarrolló en larvas del último estadio de *Diatraea saccharalis*, también conocido como gusano barrenador de la caña de azúcar, mediante el método de cría in vivo a pequeña escala, de acuerdo a la técnica descrita por Stock (1998), donde se

*Fuente: www.buenaventura.gov.co

usó el estado IJ colectados después de la primera emergencia. Para este proceso fueron necesarios los siguientes pasos:

1. Calibración de el volumen de la suspensión con IJ= 250 NEPs/ml
2. Se adicionó la suspensión de nematodos para 10 larvas de *D. saccharalis*, en la oscuridad. Luego en los días 9 -10 se retiraron los cadáveres y se colocaron en trampa White, para la recuperación de las formas infectivas.
3. En la trampa White, se recolectaron los IJs que emergieron del cadáver y se depositaron en tubos Falcón de 50 ml con agua milli-Q®.

Las trampas White (Fig. 5) consistieron en tapas de caja Petri invertidas a las que se le colocó encima una pieza de papel toalla, dentro de recipientes de 16 oz, en las que se vertió agua milli-Q®, de tal forma que el papel entrara en contacto con el líquido superficial. Seguido de ello, se depositó sobre el papel de 4 a 5 larvas de *D. saccharalis* típicamente infectadas con nematodos. Los nematodos fueron colectados los tres primeros días y lavados mediante decantaciones sucesivas y almacenados con formaldehído al 0.01% a 4°C.



Figura 4. **A.** Larvas desinfectadas en hipoclorito. **B.** larvas *D. saccharalis* en su último estadio. **C-D.** Larvas inoculadas con nematodos entomopatógenos.

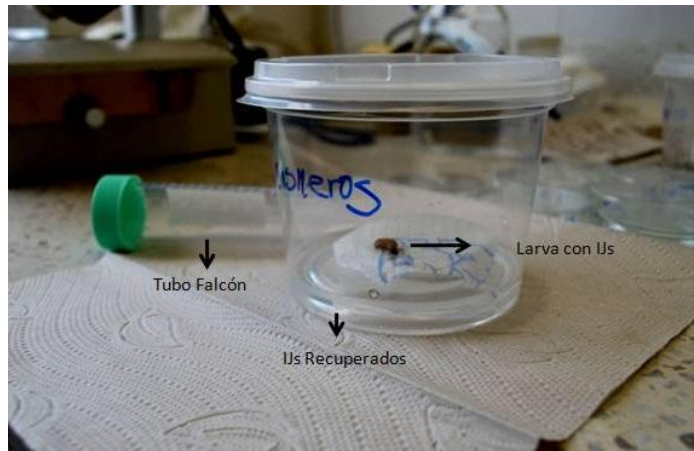


Figura 5. Trampa White utilizada para la recuperación de IJs. Las formas infectivas fueron almacenadas en tubos falcón de 50 mL.

7.3.2 Cuantificación de Nematodos

La cuantificación de los nematodos se realizó a través de diluciones empleando el método propuesto por Woodring y Kaya (1988). El primer paso de esta técnica fue tomar 1 ml de la solución madre y diluirla en 9 ml de agua milli-Q®, homogenizándola manualmente y tomar un ml de esta solución y diluirla en 9 ml de agua milli-Q® y así sucesivamente hasta obtener en la muestra de 100 µl donde se puedan contar los nematodos en una caja Petri de 100 mm x 60 mm de altura y diámetro, respectivamente. Luego de ello se realizó el conteo de los juveniles infectivos vivos bajo el microscopio estereoscópico. De cada aislamiento se tomaron 10 submuestras para hacer el conteo.

La fórmula empleada para determinar la concentración es: $A = \frac{D \times C}{B}$

Donde:

A = Mililitros de la suspensión de la concentración conocida y de la suspensión a ser diluida.

B = Números de nematodos/ml. En la suspensión a ser diluida

C = Volumen final en mililitros de la nueva dilución

D = Concentración deseada en la nueva dilución.

C-A = Mililitros de agua a ser agregados para hacer la nueva dilución (Woodring y Kaya, 988).

7.4. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La caracterización morfológica se realizó con los estadios de cada una de las especies de NEPs recuperados. En primera instancia, se determinó el ciclo biológico de cada uno de los aislamientos, en la que el proceso de infección y disección se repitió 10 veces para confirmar la presencia de cada estado de vida. La disección de cadáveres de *D. saccharalis* se hizo día tras día, cada 6 horas hasta la culminación del ciclo. Además, mediante las disecciones, se hicieron observaciones sobre los sitios de invasión, características de cada estado y cambios morfológicos durante el ciclo (Fig. 6). Se aislaron los adultos de la primera y segunda generación, incluyendo hembras y machos. Los NEPs fueron muertos por calor en solución Ringer (Woodring y Kaya, 1988) y procesados para microscopía óptica y electrónica de barrido. Los infectivos juveniles fueron tomados de las trampas White e incluidos en estos dos procesos (Fig. 7).

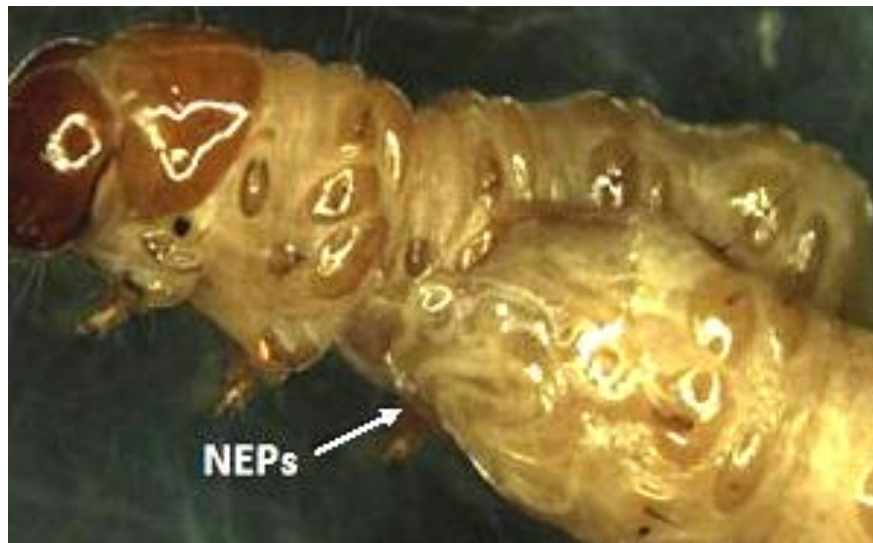


Figura 6. Larva parasitada con NEPs. Los nematodos fueron separados por sexo para el tratamiento de microscopía óptica.

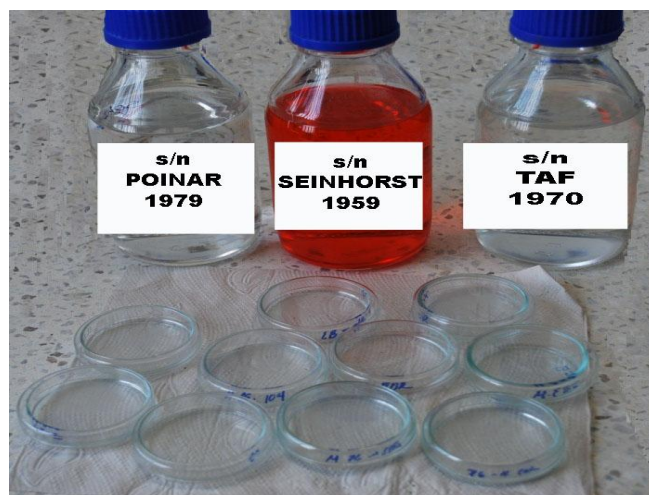


Figura 7. Soluciones utilizadas para el tratamiento de placas permanente. Nematodos depositados en cajas Petri para microscopía óptica.

7.4.1 Preparación de muestras para Microscopía Óptica

La metodología para el tratamiento de los adultos fue diferente, debido a que estos son más susceptibles a deteriorarse durante el procesamiento que los infectivos juveniles, los cuales presentan la doble cutícula que los hace más resistentes.

7.4.2 Preparaciones permanentes de NEPs Adultos (Poinar, 1975)

Después del proceso de muerte, los adultos y las formas infectivas se depositaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro con la solución fijadora TAF, que contiene 7% de formaldehído, 2% trietanolamina y 91% de agua destilada (Southey, 1970), en la cual permanecieron un mínimo de 4 – 5 días. Luego de ello para su inclusión en glicerina pura, se pasaron a una solución con 75% de etanol (95%), 5% de glicerina y 25% de agua, durante 4 -5 días; donde progresivamente se fueron destapando, hasta la total evaporación del etanol y el agua, todo a temperatura ambiente. A continuación el proceso de inclusión se cumplió dentro de una cámara de deshidratación conteniendo sílica-gel en un rango de 3 días o más, hasta su completa deshidratación.

Finalmente, los ejemplares se montaron sobre una gota de glicerina pura deshidratada sobre un cubreobjetos y sellados con parafina para evitar su evaporación y movimiento.

7.4.3 Preparaciones permanentes de IJs (Método Rápido de Seinhorst 1959)

Después del proceso de muerte, los IJs fueron transferidos a solución fijadora TAF por 24 horas. Luego de ello, a una mezcla con 20% de etanol al 96, 1% de glicerina y 79% de agua destilada. Posteriormente se colocaron en una incubadora dentro de una campana de desecación conteniendo un exceso de etanol al 96% por un tiempo mínimo de 12 horas. Posteriormente se les adicionó en el mismo recipiente una solución II con 5% de glicerina y 93% de etanol. Esta solución se modificó adicionando 2% de una solución de rojo neutro al 0.4% para facilitar la observación de algunas de sus estructuras. Los IJs se mantuvieron en incubadora a 40°C hasta la total evaporación de Etanol por un periodo de aproximadamente 3 horas. Finalmente los ejemplares se montaron sobre una gota de glicerina pura deshidratada sobre un cubreobjetos y fueron sellados con parafina para evitar su evaporación y posibles movimientos.

7.4.4 Preparaciones para Microscopia Electrónica de Barrido

La preparación de las muestras para las observaciones en el microscopio electrónico de barrido se realizó siguiendo el método de Meek (1976), lo cual permitió observar estructuras que requieren un mayor detalle morfológico para su identificación, como son las papilas labiales, cefálicas y genitales en machos, estriaciones, fasmidios en las formas infectivas juveniles, entre otras, las cuales no son observables en microscopia óptica.

Las muestras se procesaron a partir una solución de glutaraldehido al 2.5 %, por 12 horas. Posteriormente se post-fijaron en tetraóxido de osmio (1%) y se deshidrataron en series ascendentes de alcoholes hasta etanol absoluto. Posteriormente se sometieron a secado de punto crítico con CO₂ líquido y se recubrieron con oro para su observación en microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6490 LV y de la Escuela de Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle.

7.5 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMETRÍA DE LOS AISLAMIENTOS

Las descripciones de machos, hembras e infectivos juveniles fueron hechas con base en las características morfométricas y caracteres morfológicos

usadas comúnmente para la identificación de nematodos entomopatógenos (Nguyen y Smart, 1995; Qiu *et al.*, 2004; Phan *et al.*, 2003; Stock *et al.*, 2001). Los especímenes de la primera y segunda generación de machos y hembras, así como el tercer estado juvenil (IJ3) de cada aislamiento fueron usados para la caracterización morfológica (Nguyen y Smart, 1993). Donde se analizó el dato de 25 individuos que se ajustaron a la normalidad. En este proceso se utilizó un microscopio de luz Nikon Eclipse 80i equipado con DIC (contraste diferencial de interferencia) para resaltar algunas de las estructuras de los individuos, con este se tomaron imágenes de los diferentes caracteres diagnósticos determinados según cada estadio. Posteriormente, se utilizó un sistema de análisis de imágenes Image-Pro plus Media Cybernetics (v.6.3) calibrado según las escalas a utilizar (4x, 10x, 40x y 100x), en el que a cada imagen se le realizaba su respectiva morfometría (Fig. 8 y 9).



Figura 8. Fotomicrografía de la región cefálica de un macho, donde se observa la medida de la longitud del estoma y la distancia del estoma al poro excretor.

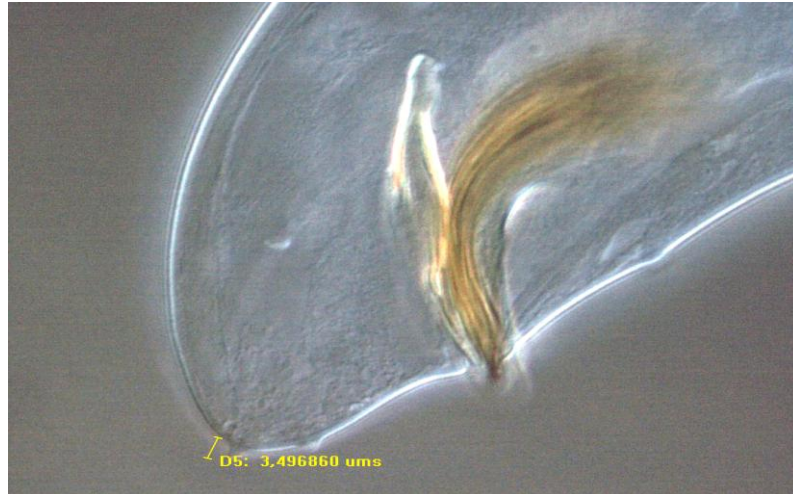


Figura 9. Fotomicrografía de la región caudal de un macho, donde se observa la medida del mucrón.

7.5.1 Caracteres Morfológicos Considerados en las Formas Infeccivas

1. Longitud total (LT)
2. Anchura máxima (AM)
3. Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor (LPE)
4. Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso (LAN)
5. Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe (LBF)
6. Longitud de la cola (LC)

Índice A = Longitud total (LT) / Anchura máxima (AM)

Índice B = Longitud total (LT) / Distancia-cabeza-base de la faringe (LBF)

Índice C = Longitud total (LT) / Longitud de la cola (LC)

Índice D = Distancia cabeza-poro excretor (LS) / Distancia-cabeza-base-faringe (LBF)

Índice E = Distancia-cabeza-poro excretor (LS) / Longitud de la cola (LC)

Índice F = Anchura máxima (AM) / Longitud de la cola (LC)

7.5.2 Caracteres Morfológicos Considerados en los Machos

1. Longitud total (LT)
2. Anchura máxima (AM)
3. Longitud del estoma (LS)
4. Anchura del estoma (AE)
5. Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor (LPE)
6. Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso (LAN)
7. Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe (LBF)

8. Distancia desde el ano a la reflexión del testículo
9. Longitud de la cola (LC)
10. Anchura a nivel del ano (AN)
11. Longitud de las espículas (LE)
12. Longitud de la cabeza de la espícula (manubrium) (LM)
13. Anchura de la cabeza de la espícula (AE)
14. Longitud del gubernáculo (LG)
15. Anchura del gubernáculo (AG)
16. Longitud del mucrón (LMT)

Índice A = Distancia cabeza-poro excretor (LS) / Distancia-cabeza-base-faringe (LBF)

Índice B = Distancia-cabeza-base-faringe (LBF)/ Longitud total (LT)

Índice C = Longitud de la cola (LC)/ Longitud total (LT)

Índice D = Longitud de las espículas (LE)/ Longitud total (LT)

Índice E = Longitud de las espículas (LE)/ Longitud de la cola (LC)

Índice F = Longitud del mucrón (LMT)/ Longitud total (LT)

Índice G = Longitud del gubernáculo (LG)/ Longitud de las espículas (LE)

Índice H = Longitud de las espículas (LE)/ Anchura a nivel del ano (AN)

Índice SW= Longitud de la espícula (LE)/ Longitud Total (LT)

7.5.3 Caracteres Morfológicos Considerados las Hembras

1. Longitud total (LT)
2. Anchura máxima (AM)
3. Longitud del estoma (LS)
4. Anchura del estoma (AE)
5. Distancia del extremo de la cabeza hasta el poro excretor (LPE)
6. Distancia del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso (LAN)
7. Distancia del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe (LBF)
8. % Vulva
9. Longitud de la cola (LC)
10. Anchura a nivel del ano (AN)

Índice A = Distancia cabeza-poro excretor (LS) / Distancia-cabeza-base-faringe (LBF)

Índice B = Distancia-cabeza-base-faringe (LBF)/ Longitud total (LT)

Índice C = Longitud de la cola (LC)/ Longitud total (LT)

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CICLO BIOLÓGICO DE LOS AISLAMIENTOS

Mediante las disecciones de las larvas inoculadas, se pudo comprobar que las formas infectivas de los diferentes aislamientos depositados sobre las larvas del último instar de *D. saccharalis*, invaden a través de la boca, ano y espiráculos, penetran la pared del sistema digestivo y entran a la cavidad corporal. En la gran mayoría de los aislamientos, se encontró que los diferentes estadios se desarrollaron en la cápsula cefálica y la parte posterior del intestino, lo que permite asegurar que estas son las zonas principales de penetración. Se observó que el IJ3, inicia su desarrollo incrementando la longitud total del cuerpo y del estoma, a medida que alcanza la cavidad corporal.

Según estudios preliminares con Steinernemátidos (Wouts, 1980), indican que cuando el suministro de nutrientes es limitado y hay superpoblación, los NEPs tienen un ciclo de vida corto y se produce una generación. En cambio cuando hay una adecuada cantidad de nutrientes, se genera un ciclo largo con dos generaciones. En el presente estudio, en los cuatro aislamientos se determinó un ciclo largo con dos generaciones (para una concentración de 250 NEPs/ ml), pero diferentes en el tiempo de duración; siendo similar para UNPS12 y UNPS15 con un rango de 10 a 12 días para su culminación, en cambio UNPS13 y UNPS14 tardaron de 9 a 10 días. La muerte de las larvas se produjo en un rango de 48 a 60 horas. En cuanto al número promedio de hembras y machos por larva, en la primera generación fue de 10 y 7 individuos, incrementándose drásticamente en la segunda generación con un valor superior a los 50 individuos, en todos los aislamientos

De manera general, los aislamientos presentaron siete estados diferentes de desarrollo: huevo, cuatro estados juveniles (IJ1, IJ2, IJ3 y IJ4), separados por mudas y adultos de los dos sexos (machos y hembras); siendo morfológicamente distintos los cuatro estados juveniles. El segundo estado juvenil (IJ2) puede ser estado preinfectivo o estado no preinfectivo, al igual que el tercer estado juvenil, como estado juvenil (IJ3) o estado no infectivo, según las condiciones alimenticias, debido a que si son las propicias este pasa a desarrollarse en estado juvenil preadulto (IJ4) (Dutky, 1974; Poinar, 1979, Sáenz, 2000).

En el segundo día, después de haber ingresado al hospedero, el estoma del juvenil infectivo se abre gradualmente, al igual que el esófago y el bulbo basal se expande hasta el doble de su tamaño inicial, mudando a IJ4 o pre-adultos machos y hembras; esto se inicia con el rompimiento de la cutícula y se da la salida del nemátodo. A medida que transcurren las horas, el ancho de los IJ4 incrementa rápidamente en función de la longitud, hasta alcanzar casi el tamaño del adulto. Durante esta fase, se va formando el sistema reproductor. Por tanto, el IJ4 muda formando la primera generación de hembra y machos jóvenes, para UNPS14 -UNPS15 en tres días y UNPS12 – UNPS15 en cuatro días.

En cuanto al apareamiento, este se inició en el momento en que un macho o más se encuentran cerca de la hembra, insertando la espícula por la vulva con el fin de dilatarla y facilitar la cópula. Al finalizar, el macho se suelta de la hembra y esta puede ser copulada por otro macho (Saénz, 1998). También se observó, que las hembras retienen en su cuerpo los huevos fecundados, eclosionando en el útero (ovovivíparas) iniciándose el proceso de nutrición de los IJ1 (endotoquia matricida). Los IJ1 mudan a IJ2 y estos pasan a IJ3, pero retiene la cutícula del IJ2, la cual le sirve de protección y le permite sobrevivir fuera del hospedero, pero como presentan condiciones alimenticias adecuadas para su desarrollo, se producen mudas sucesivas a IJ2, IJ3 y IJ4 se produce una primera generación, se repite el ciclo y se genera una segunda generación. En el desarrollo las hembras se alimentan y duran vivas cerca de 5 a 6 días, pero los machos de seis a siete días y cuando mueren ambos sexos toman una coloración marrón.

En cuanto a la morfología de los estadios juveniles, el IJ1 emerge desde el huevo con una coloración algo traslucida, que se hace blancuzca a medida que se alimenta; son activos y presenta una cutícula lisa. Región cefálica alargada, en forma de embudo, esófago y bulbo no muy estrecho. Cola cónica, filiforme atenuada, poro excretor y ano visible. Los IJ2 (Fig. 10), con cutícula lisa, protostoma-telostoma y esófago presente, istmo rodeado por el anillo nervioso, poro excretor y ano, fácilmente distinguible. Cola gradualmente filiforme y delgada al terminar. Los IJ no infectivos (Fig. 11), presentaron las mismas características del IJ2, pero lumen intestinal prominente. En el caso del IJ3 infectivo cuerpo agudo desde la región cefálica hasta la región caudal, istmo estrecho rodeado por un anillo nervioso, estoma y ano cerrado, cola larga con relación al cuerpo. El IJ4 o cuarto estado juvenil se desarrolla en preadulto macho o hembra, en ambos

casos presentaron grandes diferencias en longitud, según las generaciones (menores en la 2 generación); cutícula lisa bajo microscopía de luz, esófago ancho, anillo nervioso posterior al poro excretor, y lumen del intestino ancho. En los IJ4 hembras (Fig. 12), se observan los primordios conspicuos de la vulva y, en el IJ4 macho (Fig. 13), esófago no muy ancho con relación al adulto macho.

En resumen, los adultos de la segunda generación aparecen, para UNPS12 – UNPS15 en un rango de 8-9 días, siendo más tardío, pero mayor en UNPS13 – UNPS14 de 7-8 días. En cuanto a las características de las larvas, estas presentaron coloración amarillo ocre y textura cremosa para todos los aislamientos, pero más intensa y no cremosa en UNPS13 (Fig.14).

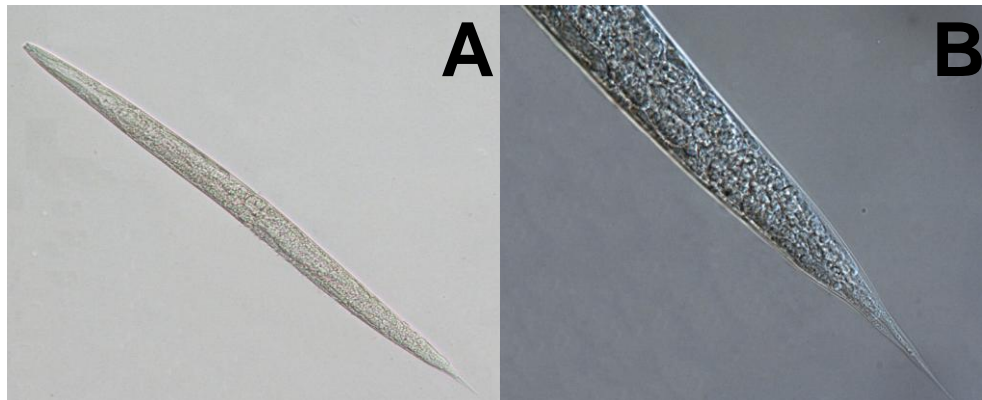


Figura 10. Fotomicrografías del segundo estado juvenil (IJ2). **A.** Longitud total (10x). **B.** Región caudal, con cola filiforme atenuada (40x)



Figura 11. Fotomicrografía del Tercer Estado juvenil no Infeccioso, donde se observa claramente un lumen intestinal prominente, esófago ancho y cola aguda. Composición fotográfica (40x).

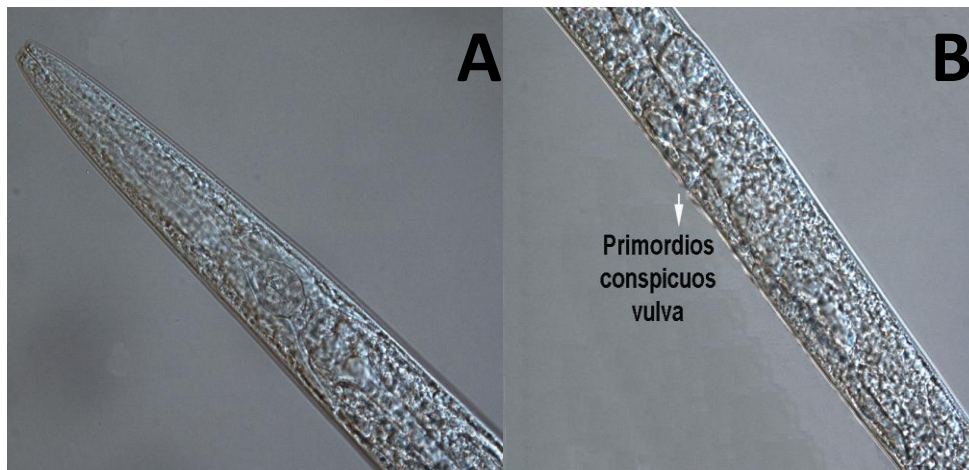


Figura 12. Fotomicrografías estado juvenil pre-adulto -IJ4 (Hembra). **A.** Región Cefálica. **B.** Primordios Conspicuos de la vulva.

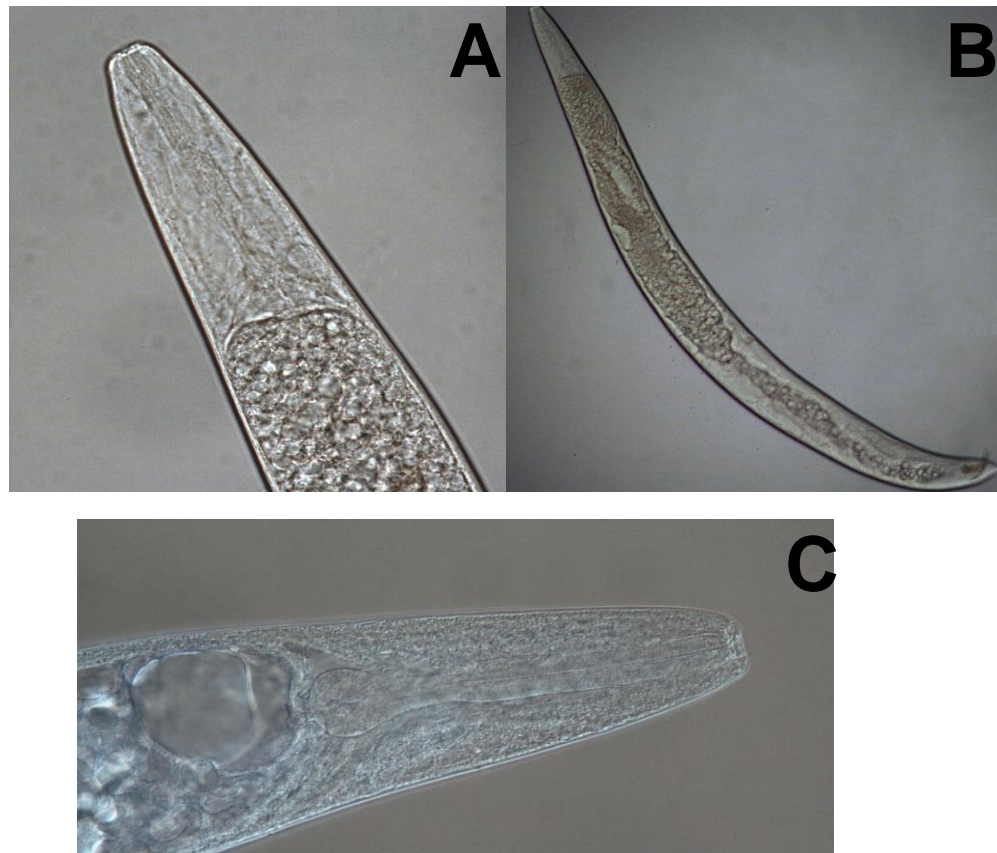


Figura 13. Fotomicrografías estado juvenil preadulto -IJ4 Macho. **A.** Región Cefálica IJ4 Macho. **B.** Longitud Total IJ4. **C.** Región Cefálica Adulto Macho.



Figura 14. Larvas *D. saccharalis* parasitadas con NEPs donde se observa su coloración amarillo ocre.

8.2. DESCRIPCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

La descripción y morfometría se realizó con base en caracteres (morfométricos y morfológicos) descritos en los puntos 6.5 y 7.5 del presente documento. Por otra parte, las observaciones y mediciones morfométricas permitieron obtener los rangos máximos y mínimos de cada estructura (esófago, espícula, largo y ancho del cuerpo, etc) así como el valor promedio, permitiendo comparar con otras especies mencionadas en las claves (Stock y Kaya, 1996; Nguyen *et al.*, 2007). El apoyo de la microscopía electrónica de barrido facilitó la observación de estructuras que requirieran mayor detalle como las papilas labiales y cefálicas, estriaciones laterales en IJs, mucrón en machos, entre otras.

8.2.1 Aislamiento UNPS12

Los individuos de este aislamiento mostraron diferencias en la morfometría para las dos generaciones (Tabla 3). Los machos de primera generación (M1G) mostraron longitud promedio de 1664 μm y 415 μm en la segunda generación (M2G) con espículas de 60 μm y 22 μm (mayor que en resto de los aislamientos), mucrón ausente en M1G, presente en M2G de 3 μm de longitud. Infeccivos juveniles 304 μm (287 μm -325 μm) con cola larga 31 μm (28 μm -32 μm) en relación con el largo del cuerpo (índice C: 10%). Hembras de tamaño 4315 μm y 1462 μm , con una vulva situada en posición posterior a la longitud media, es decir a un 62% en comparación con la longitud total.

De acuerdo con esto, el aislamiento no presenta similitud morfológicas con especies reportadas, teniendo en cuenta el análisis comparativo realizado con especies ya identificadas, debido en gran medida al diámetro de sus formas infectivas. Sin embargo la longitud de los IJs los ubica dentro del grupo *Carpocapsae* (Nguyen, 1999).

8.2.1.1 Machos de Primera y Segunda Generación

Los machos de este aislamiento en ambas generaciones se diferencian en el tamaño de los caracteres (Tabla 3) y morfológicamente en la usencia de mucrón en los M2G. Machos con longitud media de 1664 μm -415 μm para M1G y M2G (Fig. 15 A, B), presentan poro excretor situado a 33 μm y 21 μm del extremo cefálico, que corresponde a un 44 y 34% de la longitud de la faringe (índice A), es decir que se encuentra por encima del anillo nervioso (longitud faringe: 74 μm – 62 μm) (Fig.15 C).

Se observo también, estoma corto, bulbo basal alargado, istmo estrecho rodeado por el anillo nervioso, 6 papilas labiales, 4 papilas cefálicas en disco perioral. Testículo único simple, retroflexo con cola redonda (Fig. 15. D).

Espículas pares separadas con longitud de 60 μm M1G y 22 μm M2G. Como característica importante en la determinación de clasificación se encuentran la forma de la espícula, estas presentaron coloración amarilla, en algunos casos manubrio redondo, más ancho (14 μm) que largo (13 μm) M1G, lámina delgada, de tipo curvada con depresión ventral, velo que se extiende casi hasta el extremo distal, con un corte diagonal, estrechándose abruptamente dando una apariencia de una espícula con una punta muy afilada, lo cual es muy similar a la especie *S. carpocapsae* (Fig. 16. A).

El gubernáculo (Fig. 16. B) largo en proporción con las espículas (Índice G: 80%), cola sin mucrón al final, presente solo en M2G de 3 μm aproximadamente, con papilas 23 genitales y precloacales (Fig. 17).



Figura 15. Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS12. **A.** Macho de 1ra Generación (10x). **B.** Macho de 2da Generación (10x) **C.** Región Cefálica (40x) **D.** Región Caudal (40x). RC: Región Cefálica. RCD: Región Caudal. LRT: Reflexión del Testículo. BB: Base del Bulbo. AN: Anillo Nervioso. P: Poro Excretor. MB: Manubrium. ES: Espícula. GB: Gubernáculo. LC: Cola.

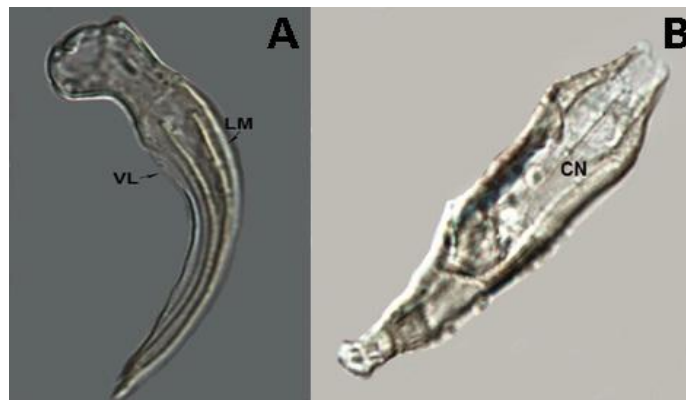


Figura 16. Fotomicrografías Aislamiento UNPS12. **A.** Espícula (100x). **B** Gubernáculo (100x). LM: Lámina. VL: Velo. CN: Cuneus.

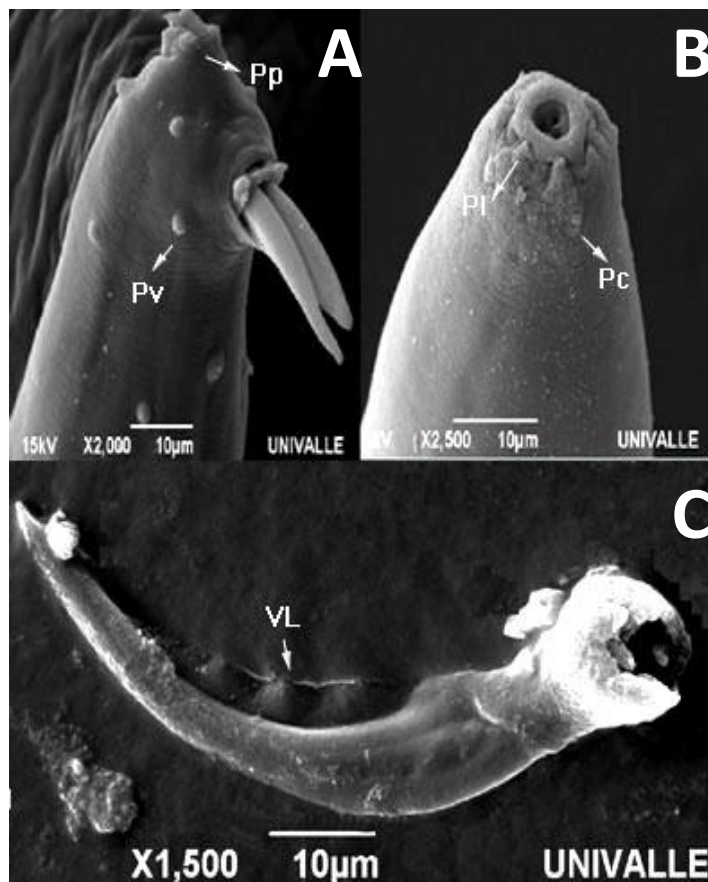


Figura 17. Micrografías electrónicas de Barrido, NEPs aislamiento UNPS12. **A.** Macho de 1ra Generación región caudal, donde se observan, las papilas genitales y precloacales. **B.** Región Cefálica, apilas labiales, estoma abierto. **C.** Espícula. Pv: Papila ventral. Pp: Papilas precloacales.

8.2.1.2 Infeccivos Juveniles (IJs)

Las formas infectivas de este aislamiento presentan abertura bucal y ano cerrado, faringe e intestinos colapsados (Fig. 18). Extremo cefálico que termina de forma redondeada con papilas cefálicas y labiales prolongadas. Poro excretor anterior al anillo nervioso, con longitud media de 304 μm (287 μm - 325 μm). El poro excretor se sitúa 18 μm del extremo cefálico que corresponde a un 32% de la longitud de la faringe (índice D). La cola filiforme larga de 31 μm (28 μm - 32 μm) con relación a la longitud de todo el cuerpo del nematodo según el índice C, con un valor de 10%. Presentan además, un fasmidio en la región posterior al ano. Patrón lateral con 8 surcos o crestas, donde las bandas 1^a, 3^a, 6^a y 8^a son mucho más marcadas que las que se encuentran en el campo central. (Fig.19).

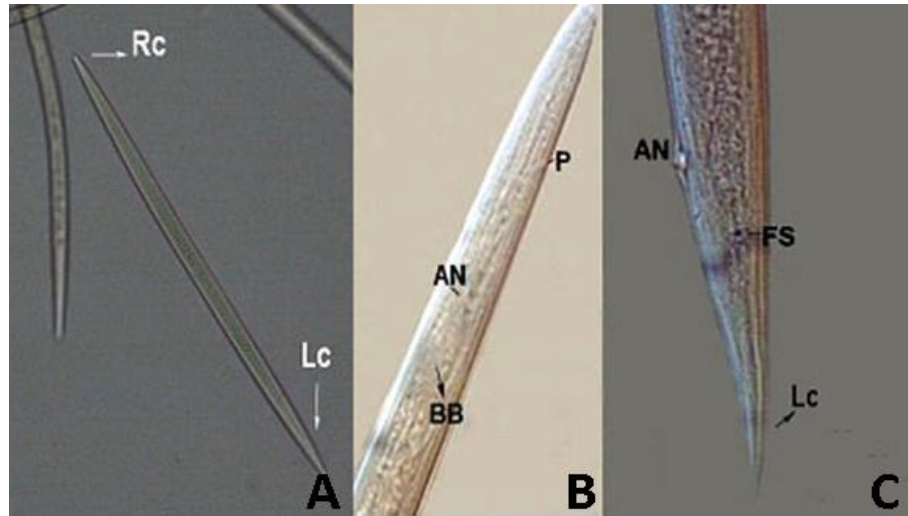


Figura 18. Fotomicrografía de IJs, aislamiento UNPS12. **A.** Longitud total IJs (10x). **B.** Región cefálica (100x) **C.** Región Caudal (40x). RC: Región Cefálica. LC. Cola. AN: Anillo Nervioso. BB: Base del Bulbo. P: Poro Excretor. AN: Ano. FS: Fascidio.

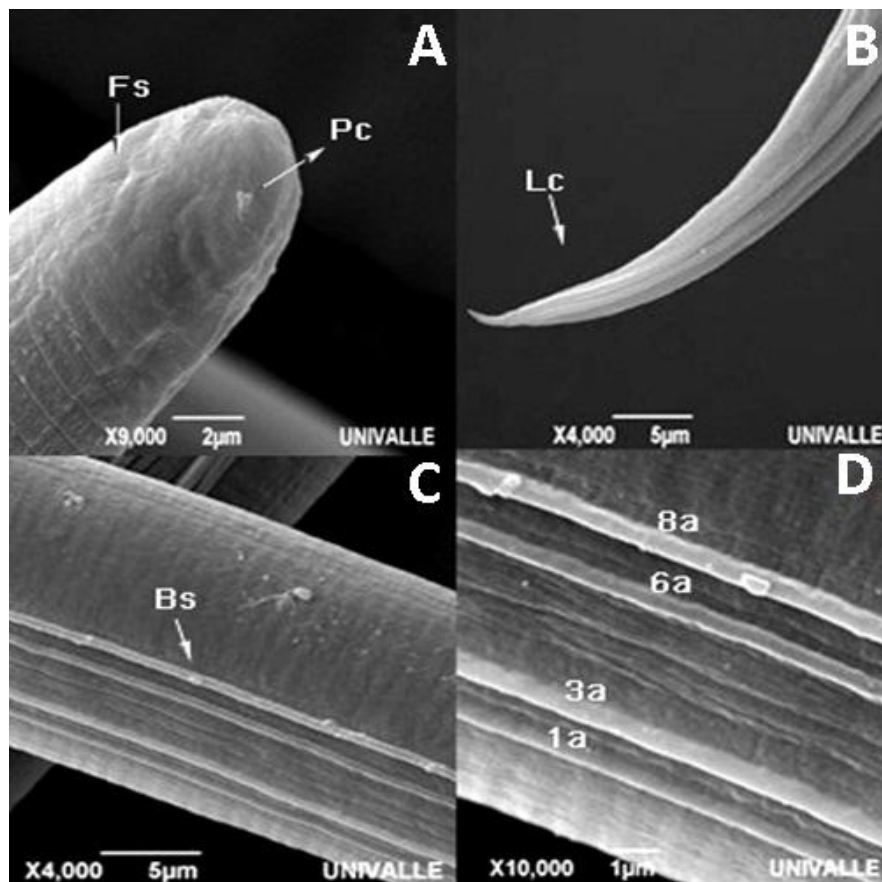


Figura 19. Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS12. **A.** Región Cefálica con papilas prolongadas **B.** Cola. **C-D.** Surcos laterales. Af: Anfidios. Lc: Cola. Bs: Bandas laterales.

8.2.1.3 Hembras de Primera y Segunda Generación

Las hembras de este aislamiento, tanto en primera como segunda generación presentaron morfología similar. Anfidelfas con ovarios retroflexos. Longitud total 4315 μm – 1462 μm (Fig. 20. A, B). Estoma similar al de los machos (Fig. 20. C). Vulva protuberante en ambas generaciones, situada en un 60% en relación con región cefálica, además se observó un tapón vulvar antes de la copula y después de esta unos labios muy prolongados que sobresalen de la vagina, no se observó epitigma (Fig. 21). Cola digitiforme en H1G con mucrón al final y conoide en la H2G, con protuberancia pequeña, en la primera generación, mayor en la segunda. Poro excretor situado en posición anterior anillo nervioso (42 μm -52 μm) siendo de mayor longitud en la H2G. Cola muy pequeña en proporción a la longitud total 22 μm -10 μm (índice C: 0.005 μm -0.003 μm). Endotoquia matricida en cada cambio de generación.



Figura 20. Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS12. **A.** Hembra adulta H1G (4x). **B.** Hembra adulta H2G (4x) **C.** Región cefálica (40X). E: Estoma. LC: Cola. RC: Región Cefálica. P: Poro. AN: Anillo Nervioso. BB: Base del Bulbo. VL: Vulva.

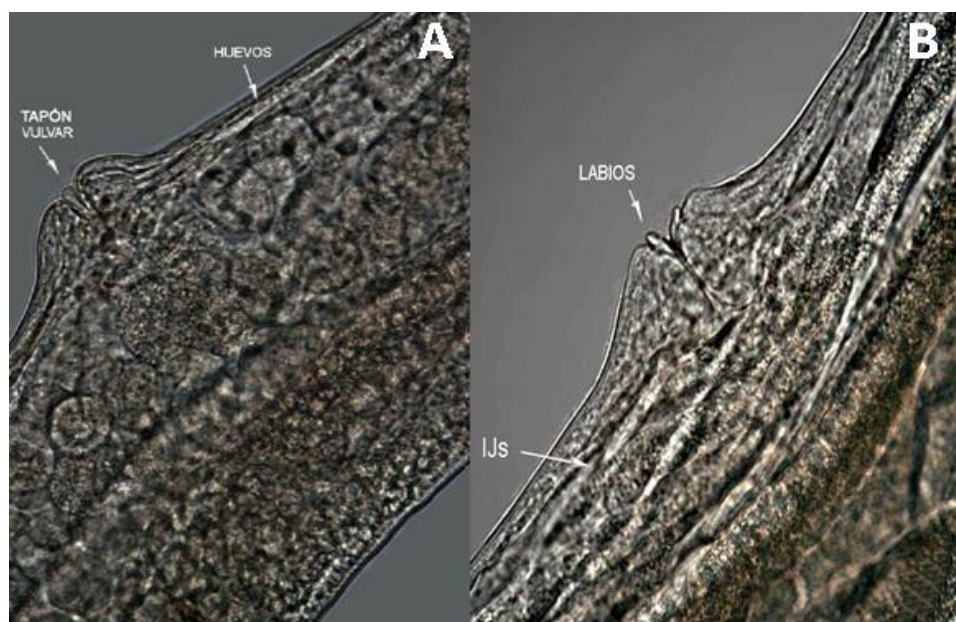


Figura 21. Fotomicrografías de la Vulva antes y después del apareamiento, aislamiento UNPS12. **A.** Tapón vulvar. Vulva (40x) y **B.** Vulva con labios prolongados, IJs en desarrollo.

Tabla 3. Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS12 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).

Caracteres/ índices (n=25)	UNPS12				
	JIs X \pm DS (rango)	M1G X \pm DS (rango)	H1G X \pm DS (rango)	M2G X \pm DS (rango)	H2G X \pm DS (rango)
LT	304 \pm 8 287-325	1664 \pm 10 1637-1680	4315 \pm 180 3904-4535	415 \pm 38 378-552	1462 \pm 56 1391-1578
AM	15 \pm 0.3 14-16	141 \pm 4 132-153	134 \pm 9 119-154	24 \pm 1 23-27	71 \pm 4 64-81
LS	-	1 \pm 0.4 1-2	4 \pm 0.6 3-5	2 \pm 0.1 2-2.3	1.9 \pm 0.2 1-2
AS	-	3 \pm 0.2 4-2	11 \pm 0.7 9-12	2.9 \pm 0.1 2.2-3	8 \pm 0.6 6-9
LPE	18 \pm 0.3 17-19	33 \pm 1 30-36	43 \pm 4 40-55	21 \pm 0.8 21-24	52 \pm 1 50-55
LAN	41 \pm 2 38-46	53 \pm 1 50-57	83 \pm 3 75-88	76 \pm 1 41-46	109 \pm 2 105-115
LBF	55 \pm 4 48-65	75 \pm 1 72-77	121 \pm 3 115-129	156 \pm 1 60-65	149 \pm 5 138-157

%V	-	-	2676±112 2449-2872	-	81±47 751-876
LRT		1152±9 1140-1176	-	297±39 238-389	-
LC	31±1 28-32	32±1 30-35	22±0.7 20-24	10±0.5 10-12	46±4 40-58
AN	-	51±1 50-54	57±4 49-68	16±1 14-18	30±0.3 30-31
LE	-	60±2 57-66	-	22±0.7 20-23	-
LM	-	13±1 11-15	-	5±0.3 4-5	-
AE	-	14±1 11-16	-	4±0.3 4-5	-
LG	-	48±2 11-16	-	17±0.7 16-19	-
AG	-	48±0.2 7-9	-	3±0.3 2-3	-
LMT	-	0	-	3±0.5 2-4	-
INDICE A	20±0.6 19-21	0.4±0.02 0.41-0.48	0.35±0.02 0.3-0.4	0,3±0.01 0.32-0.38	0.35±0.01 0.32-0.38
INDICE B	5±0.4 4-6	0,04±0.001 0.042-0.048	0.029±0.005 0.02-0.04	0,15±0.01 0.11-0.16	0.1±0.005 0.09-0.1
INDICE C	10±0.3 9-10	0,019±0.0009 0.01-0.02	0.005±0.0006 0.004-0.008	0,025±0.002 0.01-0.03	0.03±0.002 0.02-0.03
INDICE D	0.32±0.02 0.2-0.3	0,03±0.0009 0.034-0.039	-	0,005±0.004 0.03-0.05	-
INDICE E	0.58±0.02 0.5-0.6	0.03±0.0.01 0.02-0.06	-	0.1±0.01 0.1-0.2	-
INDICE F	0.48±0.01 0.4-0.5	-	-	0,008±0.0001 0.01-0.005	-
INDICE G	-	0,80±0.06 0.6-0.9	-	0,8±0.04 0.7-0.9	-
INDICE H	-	0,9±0.07 0.7-1	-	1±0.08 0.9-1	-
SW	-	0,03±0.001 0.034-0.059	-	0,05±0.004 0.03-0.05	-

Caracteres: LT: longitud total; AM: anchura máxima; LS: anchura del estoma; LPE: longitud del extremo de la cabeza hasta el poro excretor; LAN: longitud del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso; LBF: longitud del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe; LRT: longitud desde el ano al a reflexión del testículo; LC: longitud de la cola; AN: anchura a nivel del ano; LE: longitud de las espículas; LM: longitud de la cabeza de la espícula; AE: anchura de la cabeza de la espícula; LG: largo del gubernáculo; AG: anchura del gubernáculo; LTM: longitud del mucrón; **Índices Machos y**

Hembras: A: LPE/LBF; Índice B: LBF/LT; Índice C: LC/LT; Índice D: LE/LT; Índice E: LE/LC; Índice F: LTM/LT; Índice LG/LE; Índice H: LE/AN; SW: LE/LT **Índices IJs:** Índice A: LT/AM; Índice B: LT/LAN; Índice C: LT/LC; Índice D: LS/ LAN; Índice E: LS/LC; Índice F: AM/LC

8.2.2 Aislamiento UNPS13

Los individuos de este aislamiento mostraron diferencias morfométricas en las dos generaciones (Tabla 4). Los machos de primera generación (M1G) mostraron longitud promedio de 1439 μm y en la segunda generación (M2G) 600 μm con espículas de 58 μm y 27 μm (mayor que en resto de los aislamientos), infectivos juveniles de 568 μm (Rango: 520 μm -630 μm), lo que los clasifica inicialmente dentro del grupo *Carpocapsae* (Nguyen 1999). Sin embargo al observar estructuras a manera de cuerno, los ubica finalmente dentro del grupo *Bicornutum*.

IJs con cola no muy larga 65 μm (58 μm -74 μm) en relación con el largo del cuerpo (índice C: 87%). Hembras de tamaño de 7492 μm y 2806 μm con vulva situada en un 41% en comparación con la región cefálica. Por lo que se puede afirmar que el aislamiento UNPS13 presenta características morfológicas y morfométricas muy similares a las de la especie *S. abbasi*, cabeza de la espícula con proyección ventral con terminación en punta, eje casi ausente, gubernáculo con LT en 70% en relación a la espícula e infectivos en un rango de 524 μm -662 μm .

8.2.2.1 Machos de Primera y Segunda Generación

Los Machos de primera como de segunda generación del aislamiento UNPS13, presentaron características morfológicas similares, bulbo basal alargado, istmo estrecho rodeado de anillo nervioso longitud media de 1439 μm y 600 μm , poro excretor situado a 72 μm - 32 μm con relación al extremo cefálico (índice A: 40% y 10%), estoma corto, bulbo basal alargado, istmo estrecho rodeado por el anillo nervioso, 6 papilas labiales, 4 papilas cefálicas en disco perioral. Testículo único simple, retroflexo con cola redonda. El gubernáculo largo 90% en proporción a las espículas, con mucrón al final no muy notorio de 3 μm M1G y 1 μm M2G (Fig. 22).

Espículas pares separadas, con coloración amarilla (Fig. 23), lámina gruesa curvada con depresión en el lado ventral, velo que se extiende al hasta la punta, la cual no es muy es muy afilada en comparación a los demás aislamientos. Extremo caudal con papilas genitales y precloacales (Fig. 24).

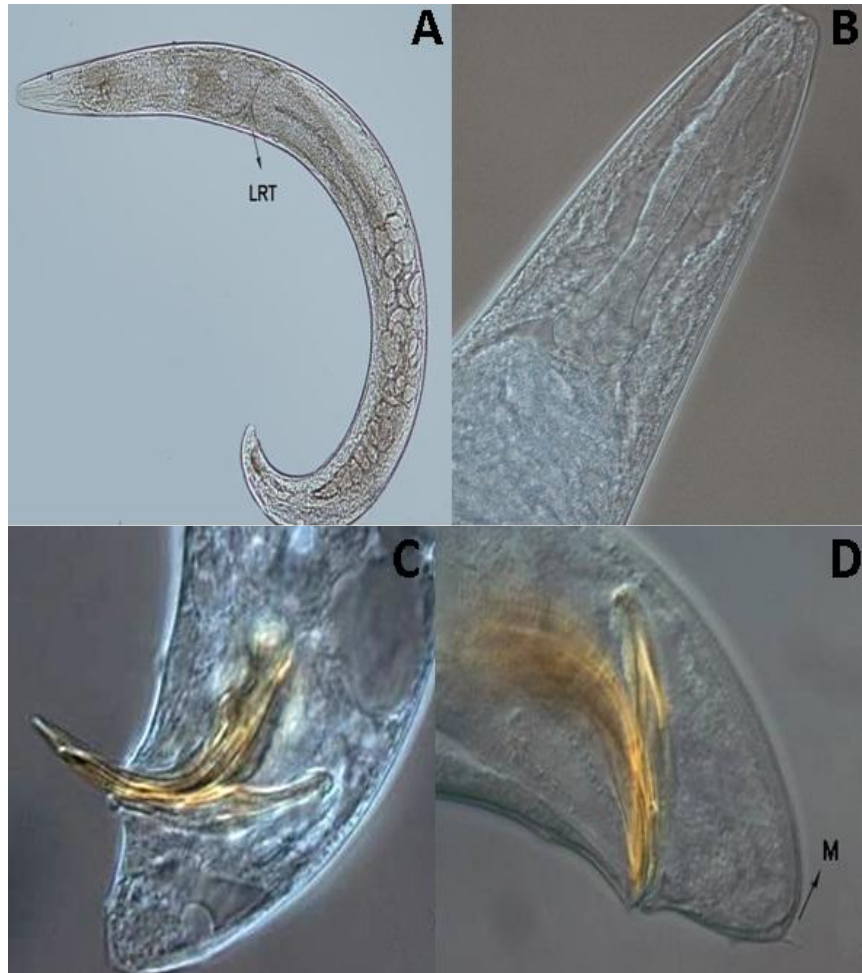


Figura 22. Fotomicrografías, Machos del aislamiento UNPS13. **A.** Macho, longitud total (10x). **B.** Macho, región cefálica (40x) **C-D.** Región Caudal (40x). LRT: Reflexión del Testículo. M: Mucrón



Figura 23. Fotomicrografías de espículas y gubernáculo de UNPS13. **A.** Espículas con manubrio redondo (100x). **B.** Posición del gubernáculo y espículas (100x). Gb: Gubernáculo. Es: Espículas.

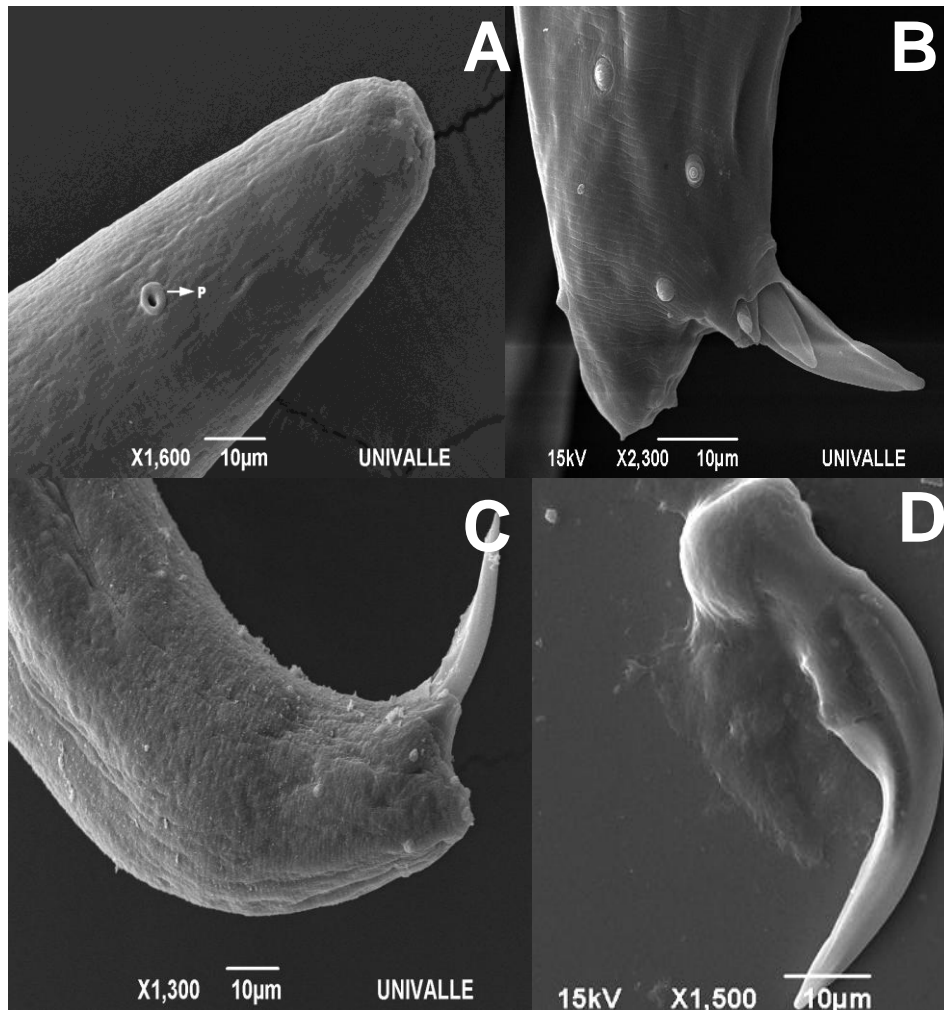


Figura 24. Micrografías electrónicas de Barrido, NEPs aislamiento UNPS13. **A.** Región Cefálica, macho de 1ra Generación, donde se observa el poro excretor. **B-C.** Región caudal. **C.** Espícula, con lámina gruesa. P: Poro excretor.

8.2.2.2 Infeccivos Juveniles (IJs)

Las formas infectivas presentan longitud media de 576 μm (520 μm - 643 μm) lo que los clasifica dentro el grupo *Carpocapsae* (Nguyen 1999). Boca, faringe y ano e intestinos colapsados. Cola filiforme atenuada, cutícula con bandas en el campo lateral. Poro anterior al anillo nervioso. El poro excretor se sitúa 72 μm - 32 μm micras con relación al extremo cefálico que corresponde a un 40% de la longitud de la faringe (índice D). La cola larga en comparación a la longitud de todo el cuerpo del nematodo (índice C: 8.7%) con una longitud de 65 μm (58 μm – 74 μm). Cola con constricción dorsal en una parte de la región caudal (Fig. 25 y 26).

Presentan campo lateral con 8 bandas, pero con la primera y octava mucho más marcadas que las que se encuentran en el campo central (Fig. 27).

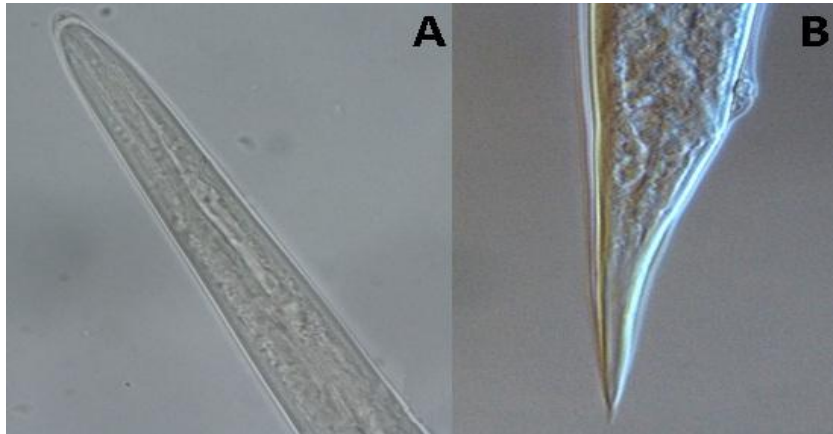


Figura 25. Fotomicrografías, IJs del aislamiento UNPS13. **A.** Región cefálica (100x). **B.** Región Caudal (100x)

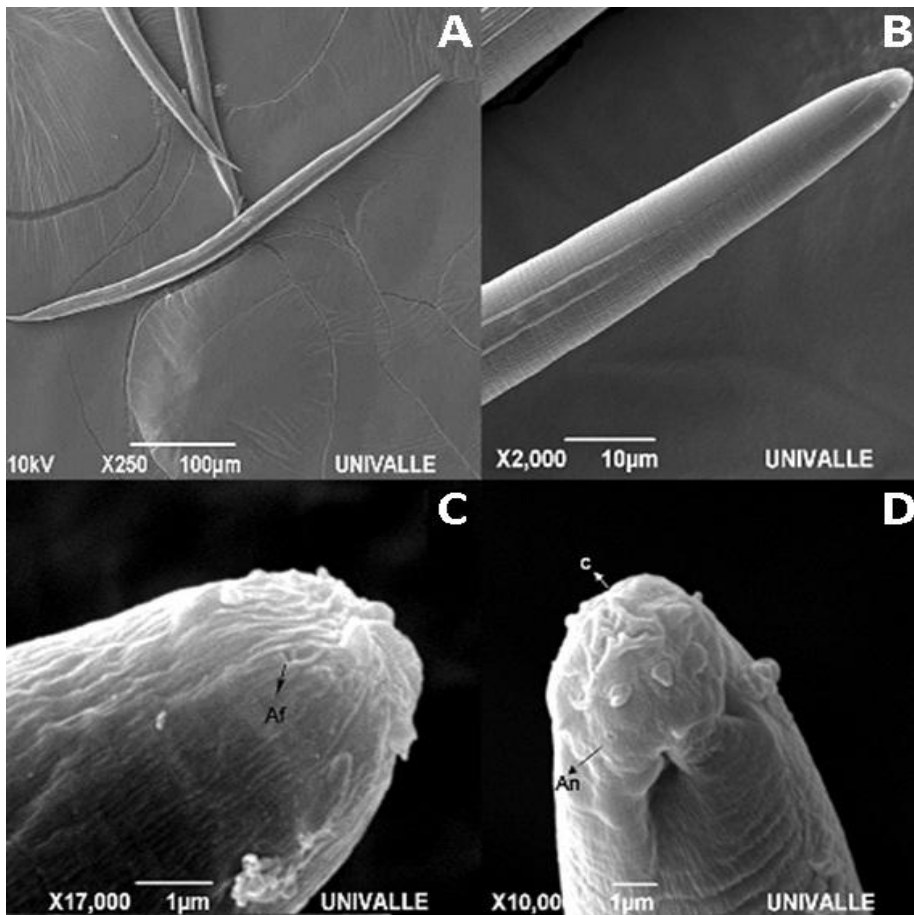


Figura 26. Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS13. **A.** Longitud total. **B.** Región Caudal, estriaciones laterales. **C.** Anidios. **D.** Estructuras a manera de cuernos. Af: Anidios. C. Estructuras a manera de cuernos.

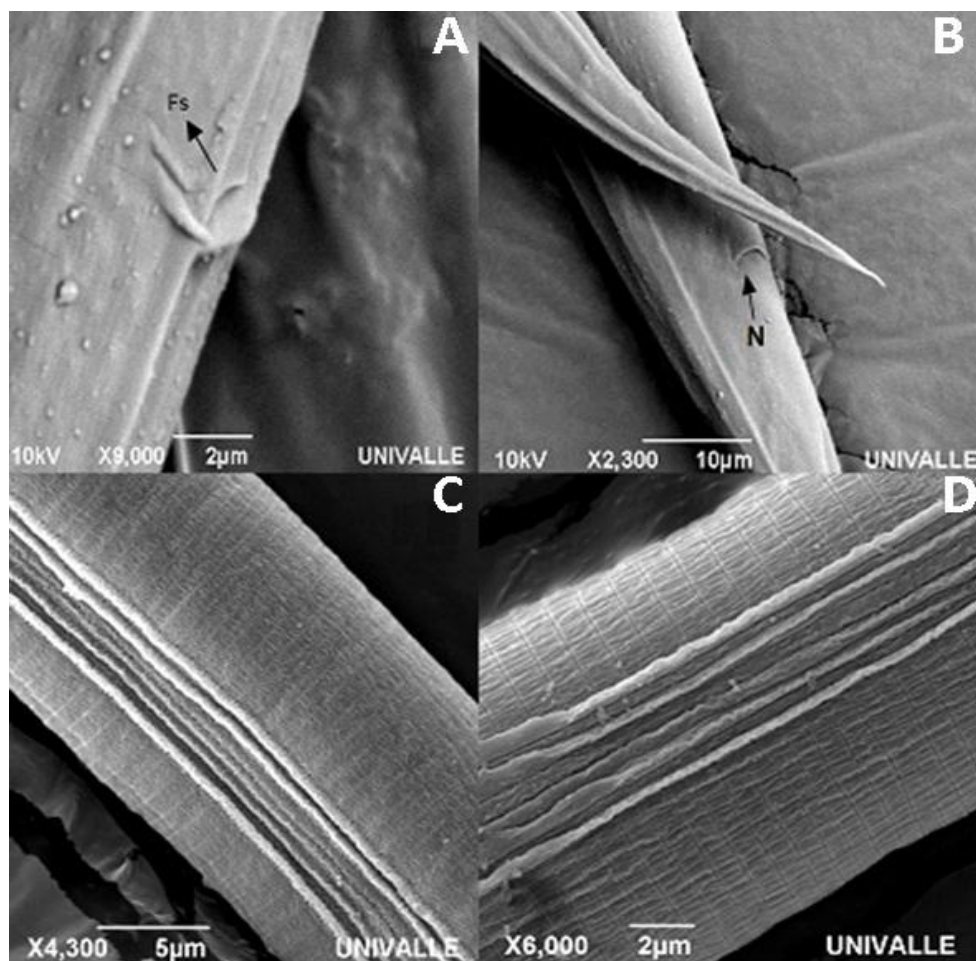


Figura 27. Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS13. **A.** Fasmidio situado en la mitad del cuerpo. **B.** Ano cerrado, cola filiforme. **C-D.** Bandas laterales.

8.2.2.3 Hembras de Primera y Segunda Generación

La morfología de las hembras no presenta características diferentes a las ya mencionadas para el género *Steinernema*. Anfidelfas con ovarios retroflexos. Longitud total 1439 µm - 600 µm (Fig. 28). Estoma similar al de los machos (Fig. 29). Endotoquia matricida en cada cambio de generación, cola digitiforme, pero muy redondeada en comparación a los demás aislamientos, con mucrón al final en ambas generaciones, protuberancia post-anal más notoria en H2G (Fig. 30). Vulva situada en un 41% con relación de longitud total, es decir que se haya por debajo de la mitad del cuerpo. Sin epitigma, con prolongación en labios (Fig. 31).



Figura 28. Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS13. **A.** Hembras de primera generación, (4x). **B.** Hembra de segunda generación (10x).

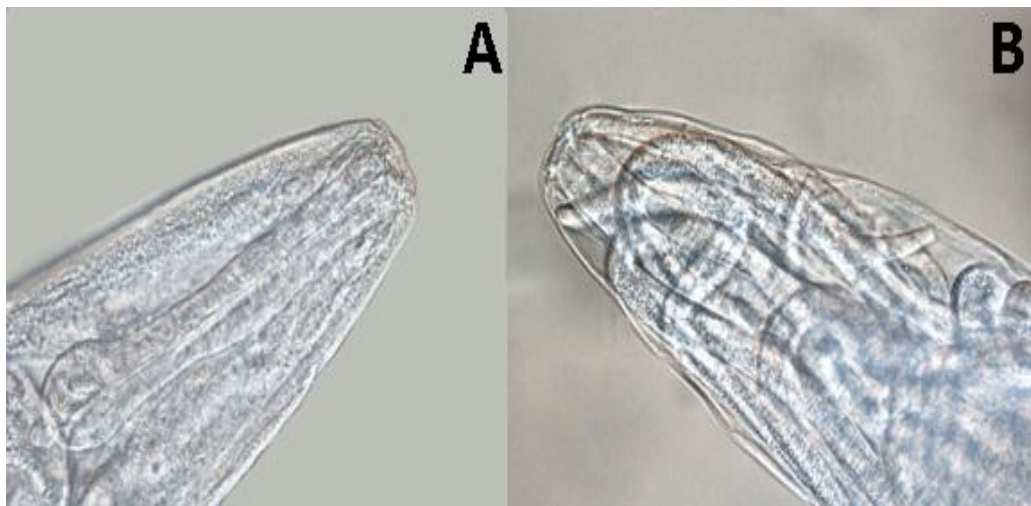


Figura 29. Fotomicrografías Región cefálica Hembras del aislamiento UNPS13. **A.** Región cefálica, normal en desarrollo (40x). **B.** Región Cefálica en Endotoquia Matricida (40x).



Figura 30. Fotomicrografías Región caudal Hembras del aislamiento UNPS13. **A.** Cola H2G, conoide con poca protuberancia postanal (40x). **B.** Cola H1G con mucrón al final. Protuberancia postanal (40x).

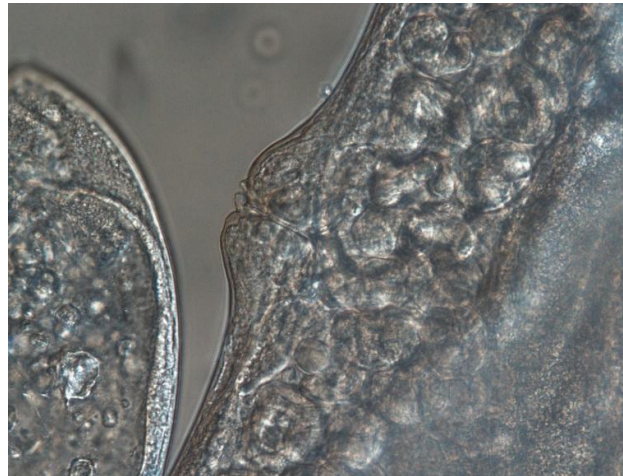


Figura 31. Fotomicrografía de la vulva, aislamiento UNPS13. Sin epityma, labios cortos.

Tabla 4. Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS13 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).

Caracteres/ índices	UNPS13				
	JIs X \pm DS (rango)	M1G X \pm DS (rango)	H1G X \pm DS (rango)	M2G X \pm DS (rango)	H2G X \pm DS (rango)
LT	568 \pm 29 520-633	1439 \pm 296 777-1895	7294 \pm 1663 4482-1195	600 \pm 52 449-743	2806 \pm 34 2078-2350
AM	29 \pm 2 25-32	137 \pm 34 79-208	258 \pm 34 219-337	46 \pm 4 39-55	106 \pm 29 59-153

LS	-	4±0.9 1-5	5±9 4-7	1±0.6 1-4	5±1 3-8
AE	-	9±1 7-12	11±2 8.5-17	3±0.8 3-7	9±05 8-10
LPE	40±2 34-46	72± 7 56-87	16±10 59-95	32± 3 27-41	60-8 28-69
LAN	77±13 42-95	107±13 55-124	89±9 73-107	96±9 43-90	46±3 40-50
LBF	109±23 60-131	156± 8 142-172	125±7 113-145	170± 3 60-74	94± 110-90
%V	-	-	3473±816 2113-481	-	1509±25 2113-481
LRT	-	876±159 485- 1144	-	364±25 316-409	-
LC	65±4 58-74	32±4 24-40	46±3 42-55	18±4 10-26	34±10 20-52
AN	-	53±6 41-63	97±9 84-118	21±6 16-42	43±15 64-20
LE	-	58±5 45-66	-	27±0.6 25-28	-
LM	-	13±1 12-16	-	18±0.2 6-7	-
AE	-	14±1 12-16	-	32±0.6 9-11	-
LG	-	50± 4 40-56	-	24± 0.5 22-25	-
AG	-	6±1 5-10	-	3±0.2 2-4	-
LMT	-	3±1 2-6	-	1±0.3 1-2	-
INDICE A	20±2 17-25	0.4± 0.06 0.3-0.5	0.6±0.009 0.5-0.8	1± 0.05 0.3-0.6	0.3±0.08 0.2-0.6
INDICE B	5±1 4-9	0.1±0.03 0.07-0.2	0.01±0.003 0.01-0.02	0.3±0.01 0.08-0.1	0.01±0.004 0.006-0.02
INDICE C	8.7±0.8 7-10	0.02± 0.006 0.01-0.04	0.006±0.001 0.004-0.001	0.06± 0.006 0.01-0.04	0.004±0.01 0.006-0.02
INDICE D	0.4±0.1 0.3-0.8	0.05±0.01 0,03-0,1	-	0.1±0.004 0,03-0,06	-
INDICE E	0.6±0.05 0.5-0.7	1.9± 0.2 1-3	-	0.1± 0.04 0.03-0.2	-
INDICE F	0.4±0.3 0.4-0.5	0.009± 0.002 0,005±0,01	-	0.007± 0.0005 0,001±0,003	-
INDICE G	-	0.9± 0.1 0,7-1	-	0.9± 0.02 0.8-0.9	-

INDICE H	-	1±0.1 0.9-1	-	1±0.2 0.5-1	-
INDICE SW	-	0.05±0.01 0,03-0,1	-	0.1±0.004 0,03-0,06	-

Caracteres: LT: longitud total; AM: anchura máxima; LS: anchura del estoma; LPE: longitud del extremo de la cabeza hasta el poro excretor; LAN: longitud del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso; LBF: longitud del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe; LRT: longitud desde el ano al a reflexión del testículo; LC: longitud de la cola; AN: anchura a nivel del ano; LE: longitud de las espículas; LM: longitud de la cabeza de la espícula; AE: anchura de la cabeza de la espícula; LG: largo del gubernáculo; AG: anchura del gubernáculo; LTM: longitud del mucrón; **Índices Machos y Hembras:** A: LPE/LBF; Índice B: LBF/LT; Índice C: LC/LT; Índice D: LE/LT; Índice E: LE/LC; Índice F: LTM/LT; Índice LG/LE; Índice H: LE/AN; SW: LE/LT. **Índices IJs:** Índice A: LT/AM; Índice B: LT/LAN; Índice C: LT/LC; Índice D: LS/ LAN; Índice E: LS/LC; Índice F: AM/LC.

8.2.3 Aislamiento UNPS14

Los individuos presentaron diferencias morfométricas en las dos generaciones (Tabla 5) en relación a su longitud. Los M1G mostraron longitud promedio de 815 µm y 515 µm en M2G siendo los de menor tamaño que los otros aislamientos. Espículas de 24 µm y 19 µm en un rango medio de que los demás aislamientos, infectivos juveniles 552 µm (Rango: 476 µm - 617 µm) con cola de longitud de 56 µm (54 µm-65 µm) en relación con el largo del cuerpo (índice C: 10%). Hembras con vulva situada en un 41% en comparación con la región cefálica, de tamaño 15913 µm y 515 µm. De acuerdo con esto, el aislamiento no presenta ninguna similitud morfológica, ni morfométricas con especies identificadas teniendo en cuenta el análisis comparativo que se hizo con las ya identificadas. Sin embargo la longitud de IJs los ubica dentro del grupo *Carpocapsae* (Nguyen 1999).

8.2.3.1 Machos de Primera y Segunda Generación

De tamaño pequeño con relación a las hembras 821 µ -515 µ (Fig. 32). Extremo anterior con 6 papilas labiales, 4 papilas cefálicas, alargadas en disco perioral. El poro excretor se sitúa en la mitad posterior a la longitud de la faringe (Índice A: 60%) y cercano a la mitad de la longitud de la faringe en la segunda generación (Índice A: 40%). Esófago similar al de las hembras. Testículo retroflexo, espículas amarillas pares curvadas, separadas con longitud 32 µm. Gubernáculo corto, con relación a las espículas 24 µm

(índice G: 80%), manubrio cuadrangular, pero más ancho que largo (Fig. 33) (Fig. 35), cola poco redonda 29 μm y 10 μm larga con relación con la espícula (Índice E: 1 μm - 2 μm), con mucrón al final con dimensiones reducidas en la segundas generaciones 5 μm - 3 μm aproximadamente. Presenta 23 papilas genitales (Fig. 34).

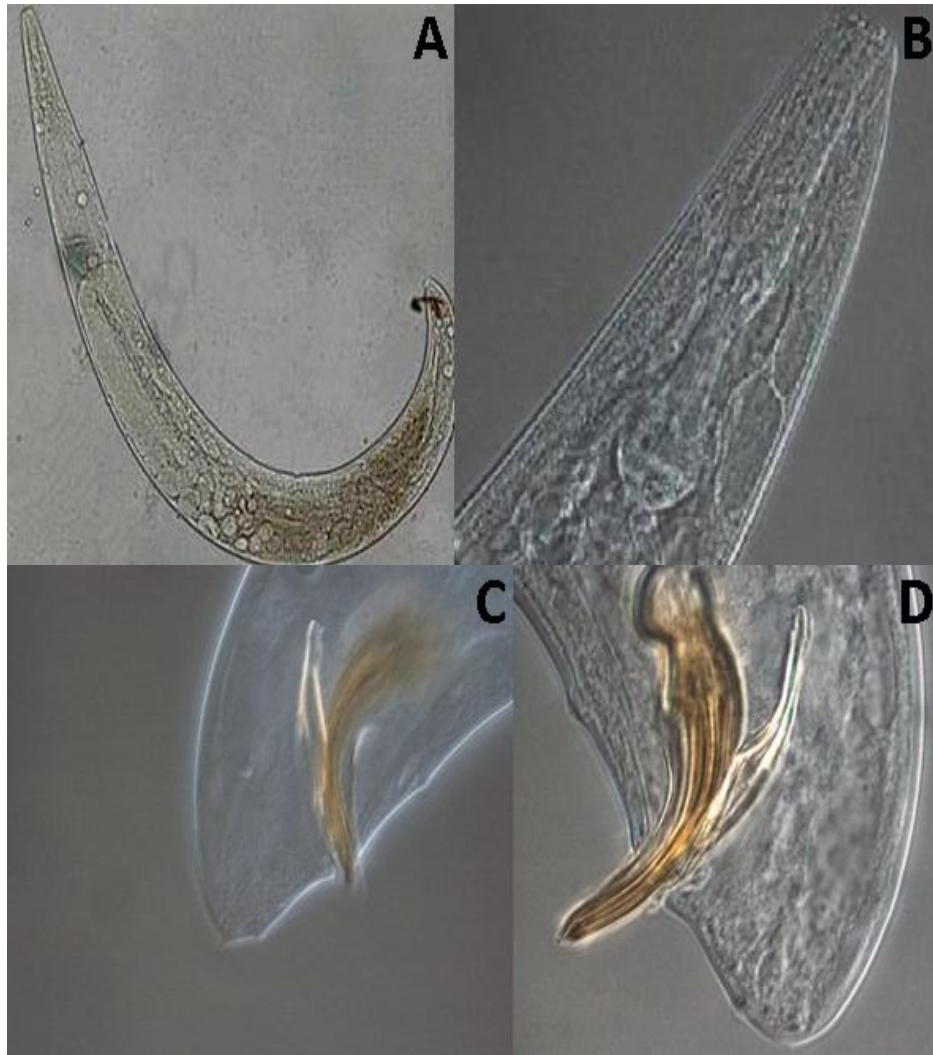


Figura 32. Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS14. **A.** Macho, longitud total (10x). **B.** Macho, región cefálica (40x) **C-D.** Región Caudal (40x) (100x).



Figura 33. Fotomicrografías espícula y gubernáculo, aislamiento UNPS14. **A.** Espícula (100x). **B.** Gubernáculo, Cuneus en forma de Y (100x).

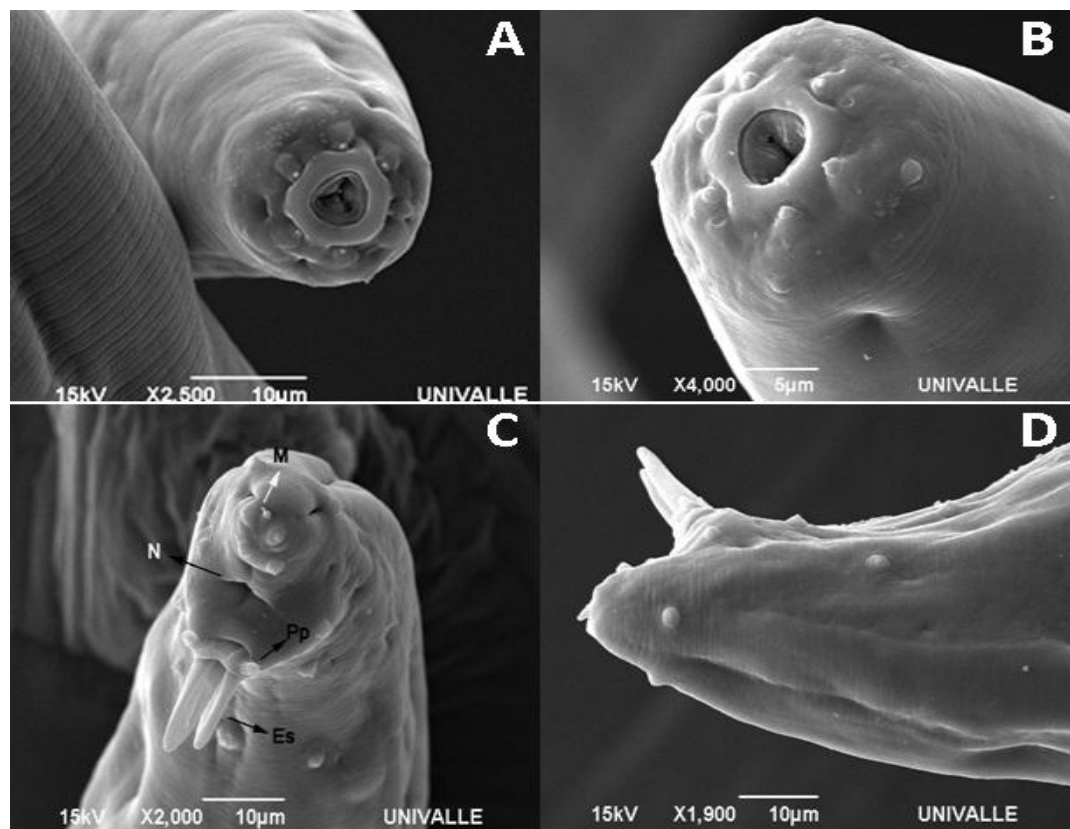


Figura 34. Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS14. **A.** Región cefálica y estriaciones laterales a lo largo del cuerpo. **B.** Estoma abierto, con 6 papilas labiales y 4 cefálicas. **C-D.** Región caudal. M: Mucrón. N: Ano. Pp: papilas prelocales. Es: Espículas.

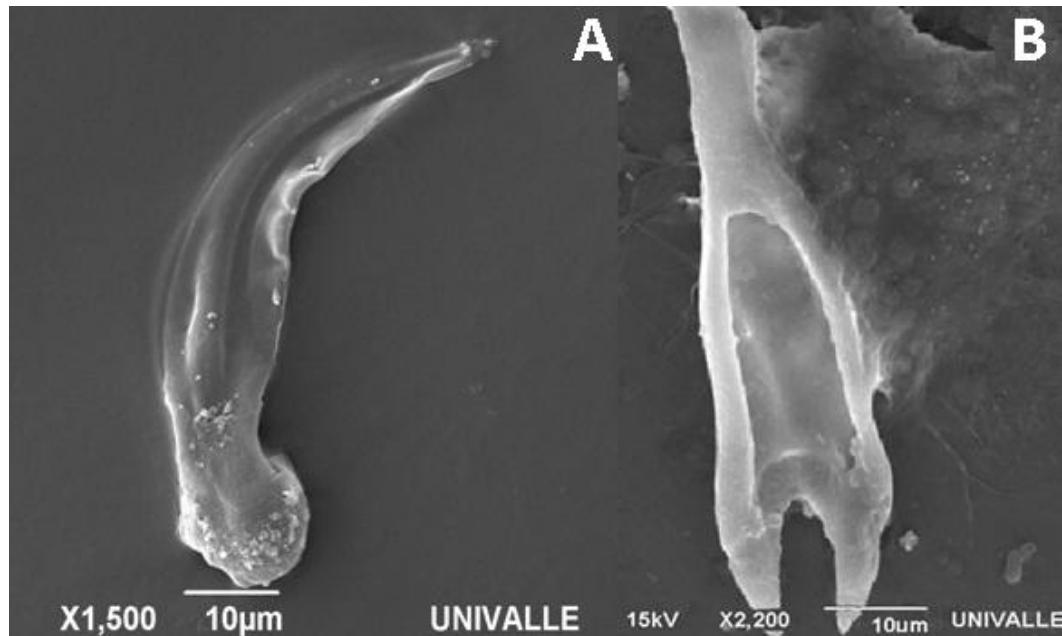


Figura 35. Micrográficas electrónicas de Barrido de espícula y gubernáculo, aislamiento UNPS14. **A.** Espícula. **B.** Gubernáculo.

8.2.3.2 Infeccivos Juveniles (IJs)

Las formas infeccivas de este aislamiento poseen una longitud media promedio de 552 μm , siendo las pequeñas registradas en el presente estudio. El extremo cefálico termina de forma completamente redondeada. El poro excretor se en posición anterior a 50 μm (Índice: 12% A) de la longitud de la faringe. Esófago largo y estrecho, con bulbo basal poco desarrollado. Cola filiforme, larga 24 μm (Índice C: 10%) con relación a la longitud total, ano cerrado y un fasmidio en la cola (Fig. 36).

Presenta además, patrón lateral con 6 bandas o crestas, siendo más notorias 1^a y 8^a, estoma cerrado, de forma triangular y anfidios en la región cefálica. Cabe notar, que con ayuda de las microfotografías de barrido se pudo observar una abertura bucal triangular, con un primer anillo 6 papilas labiales y un segundo 4 papilas cefálicas (Fig. 37).

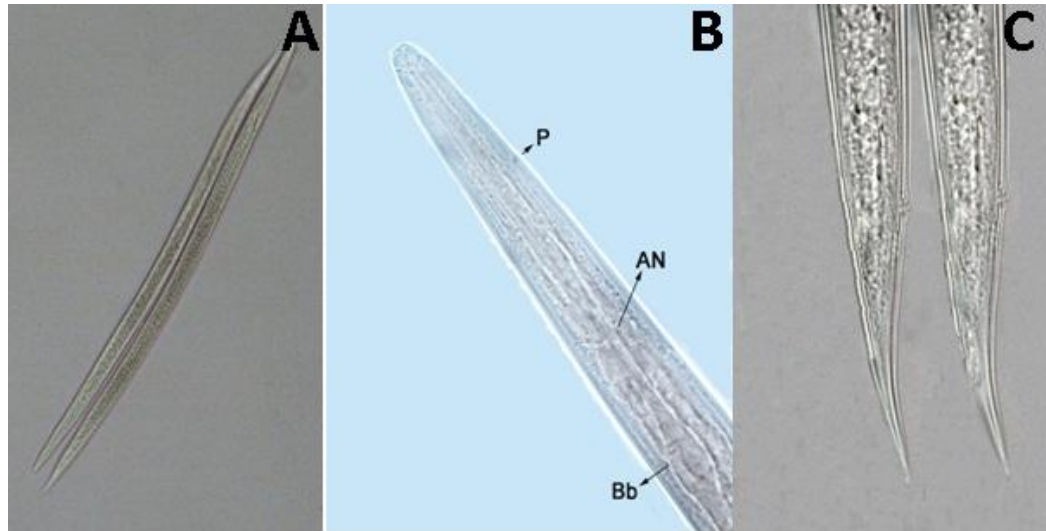


Figura 36. Fotomicrografías de IJs, aislamiento UNPS14. **A.** Longitud total IJs (10x). **B.** Región cefálica (100x) **C.** Región Caudal (100x). AN: Anillo Nervioso. Bb: Base del Bulbo. P: Poro Excretor.

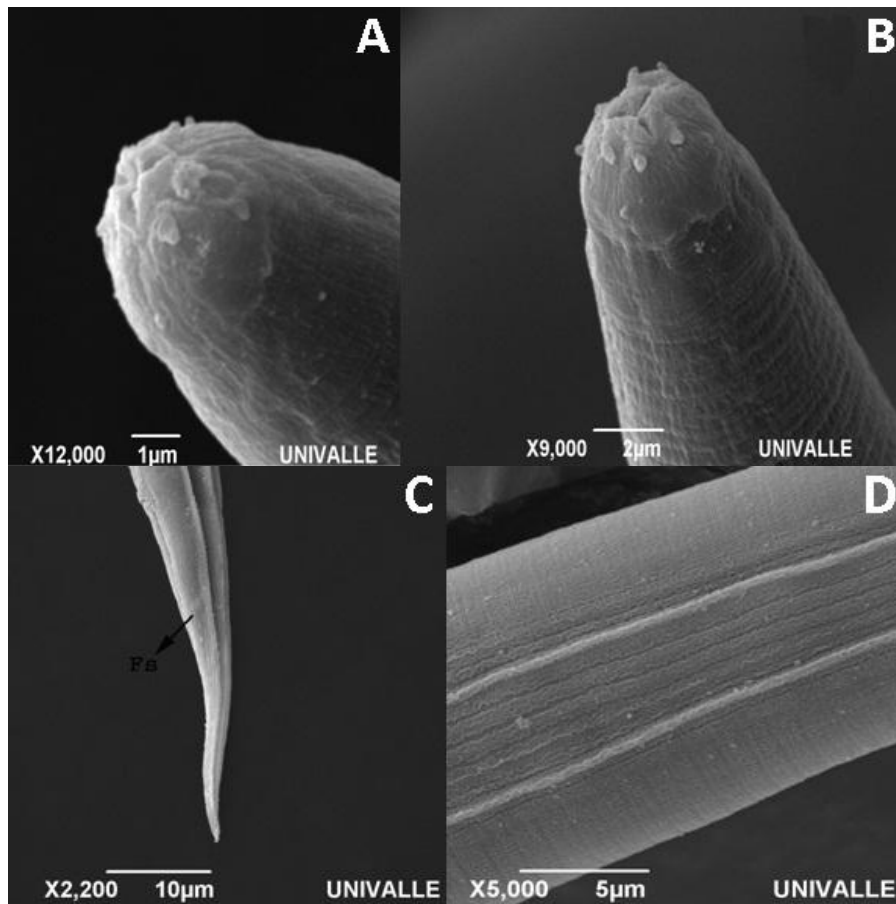


Figura 37. Micrografías electrónicas de Barrido, IJs aislamiento UNPS14. **A-B.** Región Cefálica **B.** Región caudal. **C.** Región media, estriaciones laterales. Fs: Fasciole.

8.2.3.3 Hembras de Primera y Segunda Generación

Hembras con longitud diferente $15.913 \mu\text{m}$ - $515 \mu\text{m}$ (Fig. 38) en ambas generaciones, registrando un valor mayor que el resto los aislamientos. Poro excretor evidente, ubicado con relación a la mitad con relación a la faringe (Índice A: 30%), sistema reproductor anfidélfico, retroflexo, con vulva protuberante, situada en un 41% en comparación con la región cefálica, epitigma sencillo, rodeado de labios poco sobresalientes, cola con mucrón en ambas generaciones (Fig. 39). Ovarios retroflexos.

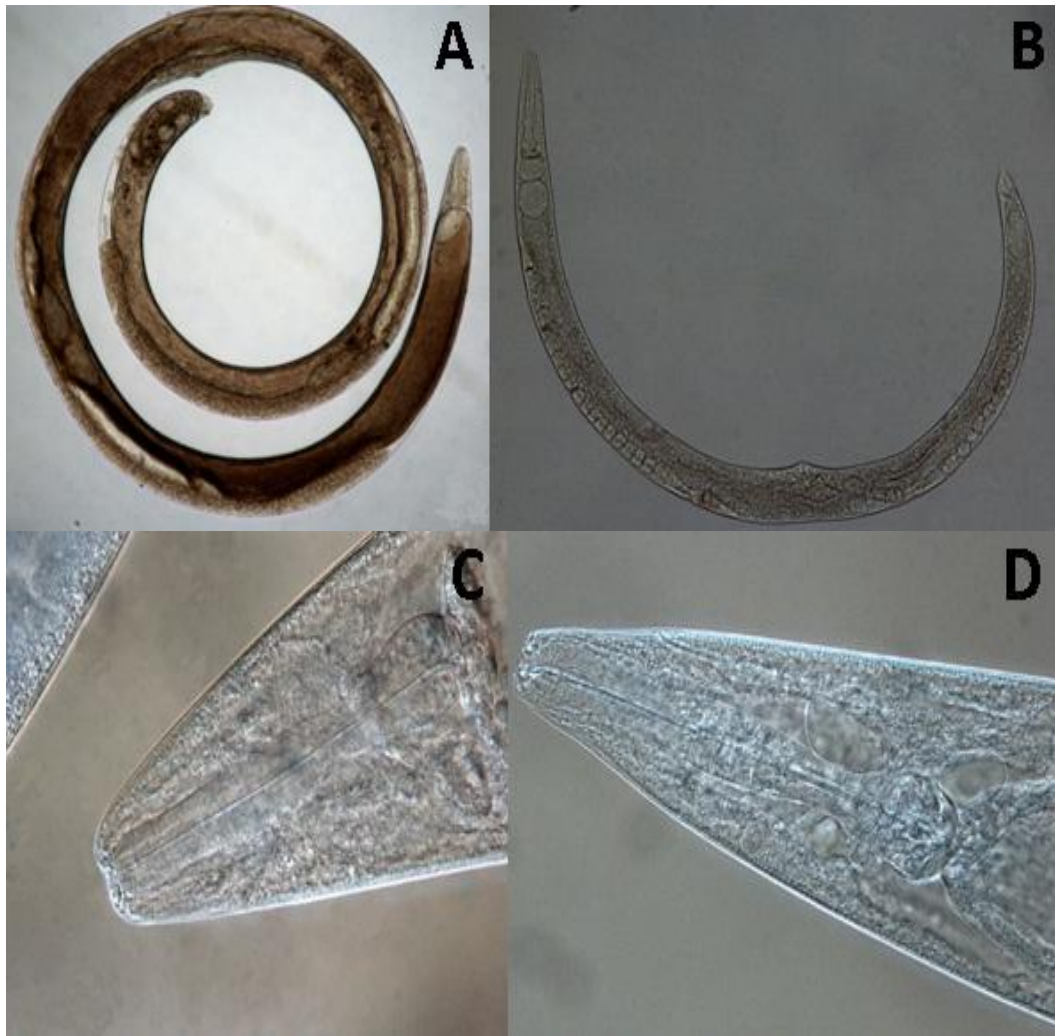


Figura 38. Fotomicrografías de Hembras, aislamiento UNPS14. **A.** Hembra adulta H1G (4x). **B.** Hembra adulta H2G (10x) **C.** Región cefálica H1G (40X). **D.** Región Cefálica H2G (40x).

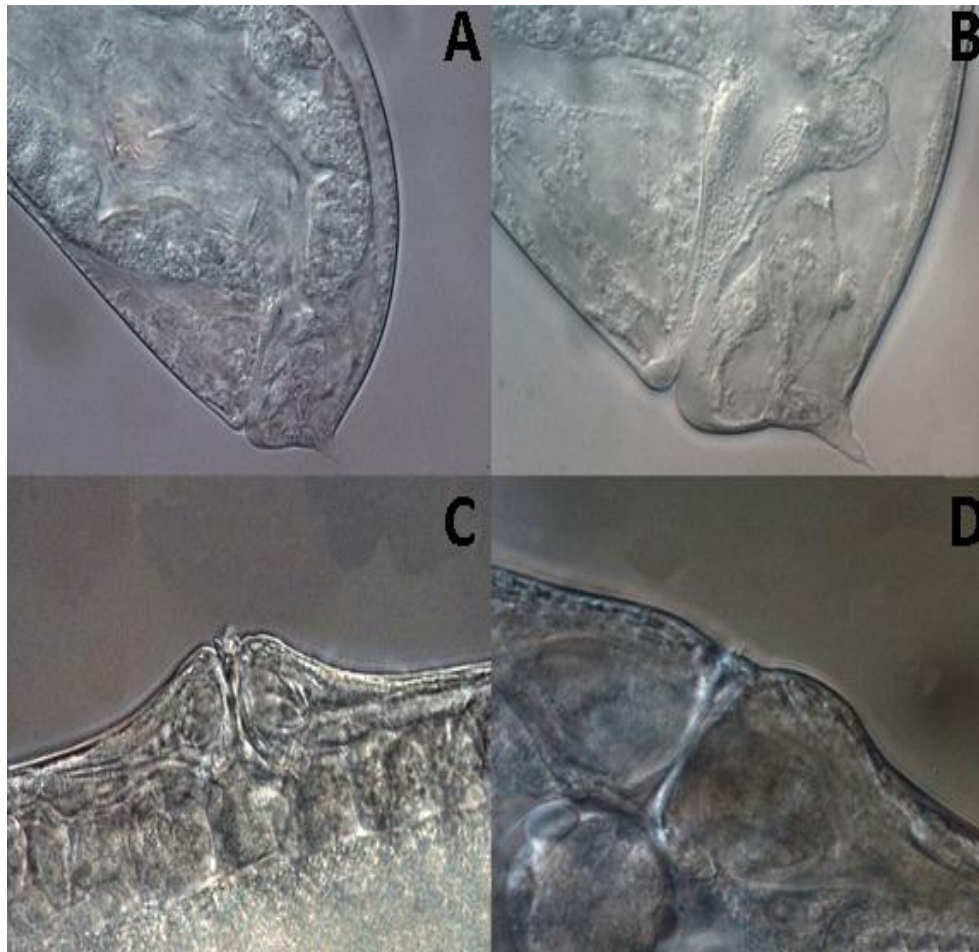


Figura 39. Fotomicrografías de región caudal y vulva, hembras aislamiento UNPS14. **A-B.** H2G (40x), H1G (40X). **C-D.** Vulva con epityma simple (40x).

Tabla 5. Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS14 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).

Caracteres/ índices	UNPS14				
	JIs X \pmDS (rango)	M1G X \pmDS (rango)	H1G X \pmDS (rango)	M2G X \pmDS (rango)	H2G X \pmDS (rango)
LT	552 \pm 32 476-617	821 \pm 105 740-1105	15913 \pm 438 415-226415	515 \pm 27 422-544	475 \pm 14 425-488
AM	25 \pm 2 20-29	75 \pm 8 65-95	210 \pm 35 108-271	23 \pm 2 21-27	22 \pm 1 21-25
LS	-	4 \pm 1 2-7	4 \pm 0.3 5-7	2 \pm 0.3 1-2	2 \pm 0.3 2-3

AS	-	7±1 4-9	9±0.8 8-12	3±0.5 2-4	4±0.3 3-5
LPE	35±2 32-38	50±15 29-80	33±3 29-40	27±7 12-45	25±3 22-36
LAN	120±4 114-131	26±10 48-94	82±3 80-86	43±0.3 41-49	59±4 52-68
LBF	81±4 75-92	125±5 70-88	124±5 108-133	65±2 61-67	84±2 80-88
%V	-		3875±899 2103-5543		215±5 206-229
LRT	-	534±101 389-851	-	256±15 232-284	-
LC	56±6 50-65	29±5 22-39	24±2 21-26	10±0.6 8-11	23±1 21-25
AN	-	42±9 26-59	55±5 49-69	18±1 16-21	15±2 13-25
LE	-	32±1 34-39	-	21±1 20-24	-
LM	-	7±1 6-10	-	4±0.6 4-6	-
AE	-	6±0.4 6-7	-	4±0.3 4-5	-
LG	-	24±1 23-28	-	19±0.3 18-20	-
AG	-	2±0.3 2-3	-	2±0.3 2-3	-
LMT	-	5±1 2-7	-	3±0.2 2-3	-
INDICE A	12±2 18-27	0.6±0.2 0.3-0.9	0.3±0.02 0.2-0.3	0.4±0.1 0.1-0.6	0.3±0.003 0.2-0.4
INDICE B	5±0.3 4-5	0.09±0.01 0.06-0.1	0.01±0.0006 0.005-0.02	0.1±0.009 0.1-0.19	0.1±0.005 0.1-0.2
INDICE C	10±2 8-15	0.03±0.007 0.02-0.05	0.03±0.001 0.05-0.02	0.01±0.001 0.01-0.02	0.03±0.003 0.04-0.05
INDICE D	0.3±0.01 0.2-0.3	0.03±0.006 0.03-0.06	-	0.03±0.003 0.03-0.05	-
INDICE E	0.6±0.07 0.5-0.8	1±0.2 0.8-1	-	2±0.2 1-2	-
INDICE F	0.4±0.06 0.3-0.6	0.003±0.001 0.003±0.07	-	0.01±0.001 0.07±0.01	-
INDICE G	-	0.8±0.05 0.6-0.8	-	0.8±0.05 0.7-0.9	-
INDICE	-	0.7±0.2	-	0.1±0.2	-

H		0.5-1		0.1-0.01	
INDICE SW	-	0.03±0.006 0.03±0.006	-	0.03±0.003 0,03-0,05	-

Caracteres: LT: longitud total; AM: anchura máxima; LS: anchura del estoma; LPE: longitud del extremo de la cabeza hasta el poro excretor; LAN: longitud del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso; LBF: longitud del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe; LRT: longitud desde el ano al a reflexión del testículo; LC: longitud de la cola; AN: anchura a nivel del ano; LE: longitud de las espículas; LM: longitud de la cabeza de la espícula; AE: anchura de la cabeza de la espícula; LG: largo del gubernáculo; AG: anchura del gubernáculo; LTM: longitud del mucrón; **Índices Machos y Hembras:** A: LPE/LBF; Índice B: LBF/LT; Índice C: LC/LT; Índice D: LE/LT; Índice E: LE/LC; Índice F: LTM/LT; Índice LG/LE; Índice H: LE/AN; SW: LE/LT **Índices IJs:** Índice A: LT/AM; Índice B: LT/LAN; Índice C: LT/LC; Índice D: LS/ LAN; Índice E: LS/LC; Índice F: AM/LC

8.2.4 Aislamiento UNPS15

Este aislamiento se caracterizó por presentar M1G, M2G, infectivos juveniles y espículas de menor tamaño con relación a los demás aislamientos (Tabla 6). Los M1G presentaron longitud promedio de 802 μm y 447 μm M2G, con espículas de 30 μm y 22 μm . Infectivos juveniles 280 μm (Rango: 264 μm - 300 μm) con una cola no muy larga de 27 μm (19 μm -25 μm) en relación con el largo del cuerpo (índice C: 10%). Hembras con vulva situada en un 62% en comparación con la región cefálica, es decir mayor la región media, de tamaño 5578 μm y 909 μm .

De acuerdo al análisis comparativo con especies identificadas, los individuos de este aislamiento no presentan similitud morfométrica. El tamaño de los infectivos juveniles, la longitud de espículas, entre otros caracteres no se ajusta a las claves taxonómicas debido a que los valores morfométricos son más estrechos. Sin embargo los IJs al tener una longitud menor a 600 μm , permite clasificarlos dentro del grupo *Carpocapsae* (Nguyen 1999).

8.2.4.1 Machos de Primera y Segunda Generación

Los machos de este aislamiento se diferencian en su longitud media de 802 μm -447 μm para M1G y M2G, presentan poro excretor situado a 34 μm y 26 μm , del extremo cefálico, que corresponde a un 45% y 37% de la longitud de la faringe (índice A) en la región media posterior (Tabla 6). Estoma corto con anchura y longitud similar en ambas generaciones, bulbo basal alargado,

istmo estrecho rodeado por el anillo nervioso, 6 papilas labiales, 4 papilas cefálicas en disco perioral. La longitud de la cola es de 15 μm y 11 μm , siendo más corta que la anchura de la misma a nivel del ano (26 μm y 18 μm). Esta menor longitud de la cola se expresa también en un elevado valor del índice E (13 μm y 16 μm) al expresar la longitud de la cola con relación a la longitud de las espículas. Se observó también testículo único simple, retroflexo con cola redonda (Fig. 40).

Las espículas presentaron en su mayoría manubrio redondeado, y en las medidas de la tabla 6, se refleja en la longitud media de la cabeza de la espícula con 6 μm - 5 μm , frente a la anchura de la misma 6 μm - 5 μm . Espículas pares separadas con longitud de 30 μm y 22 μm , con coloración amarilla, lámina gruesa, no muy curvada con una pequeña depresión ventral, velo bien desarrollado que se extiende casi hasta el extremo distal de estas (Fig. 41) (Fig. 42).

El gubernáculo de 24 μm y 19 μm , corto algo cercano a la proporción con las espículas (Índice G: 80%). Finalmente, no se observó la presencia de mucrón en el extremo de la cola en la primera generación, pero sí en la segunda con un tamaño de 3 μm . El aislamiento presentó 23 papilas genitales y precloacales en total (Fig. 43).

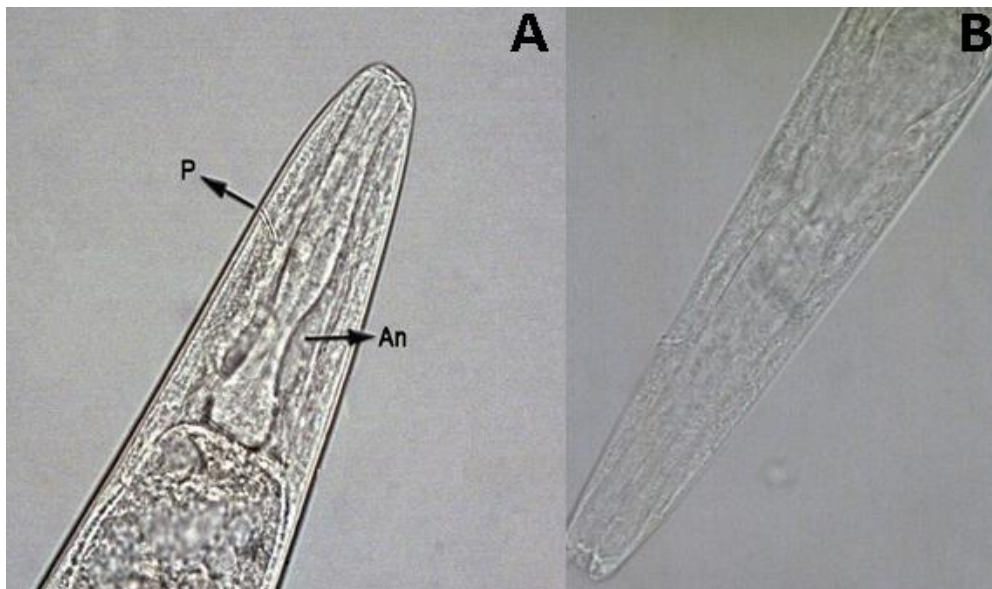




Figura 40. Fotomicrografías Machos del aislamiento UNPS15. **A.** Región cefálica, M1G y M2G (10x) (40x). **C-D.** Región Caudal (40x) (100x).

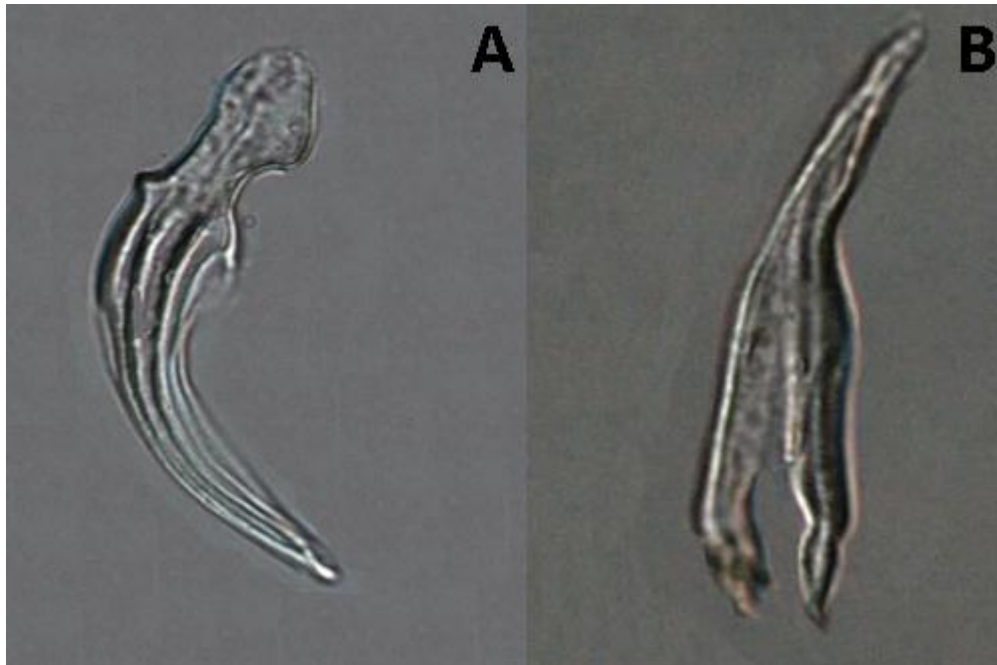


Figura 41. Fotomicrografías espícula y gubernáculo, UNPS15. **A.** Espícula (100x). **B.** Gubernáculo (100x).

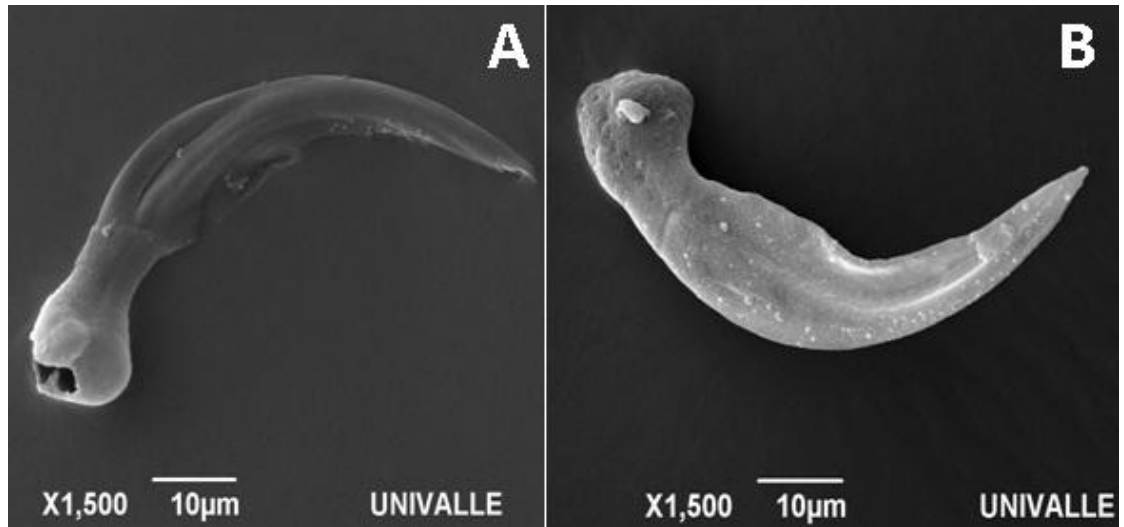


Figura 42. Micrografías electrónicas de Barrido de espículas, aislamiento UNPS15. **A-B.** Espícula con velo casi hasta el extremo distal y manubrio redondo.

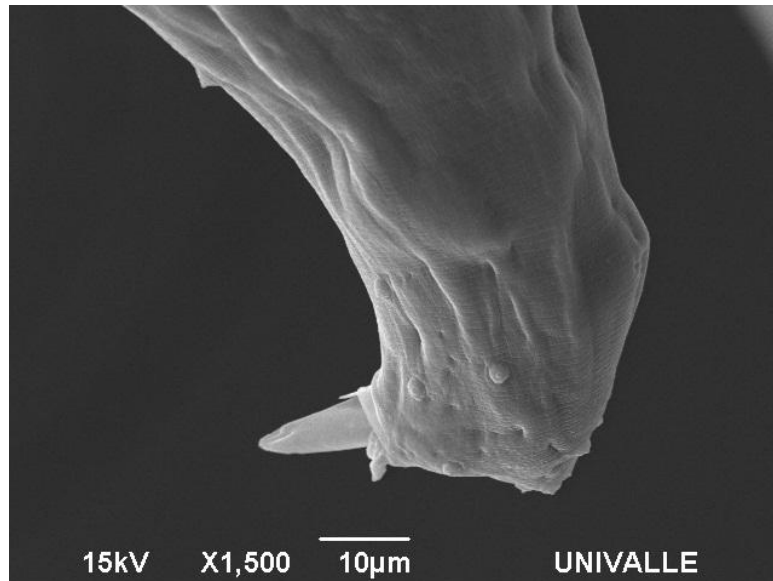


Figura 43. Micrografía electrónica de la Región caudal, Macho aislamiento UNPS14.

8.2.4.2 Infeccivos Juveniles (IJs)

Las formas infectivas presentan longitud media de 280 μm (264 μm - 300 μm), con boca y anos cerrados, faringe e intestinos colapsados (Fig. 44). El poro excretor se sitúa en un rango de 17 μm - 19 μm con relación al extremo cefálico que corresponde a un 30% de la longitud de la faringe (índice D). Con relación a la longitud del cuerpo (índice C: 10%) la cola es muy

pequeña, su longitud fue de 27 μm (22 μm – 31 μm), de tipo dorsalmente convexa – conoide con pequeños poros alrededor de la misma. Extremo cefálico con una depresión y terminación redondeada. Se observo fasmidios posición posterior al anillo nervioso muy prominentes, una de estos presenta una especie de nervadura (Fig. 45). Patrón lateral con 6 surcos (Fig. 46).

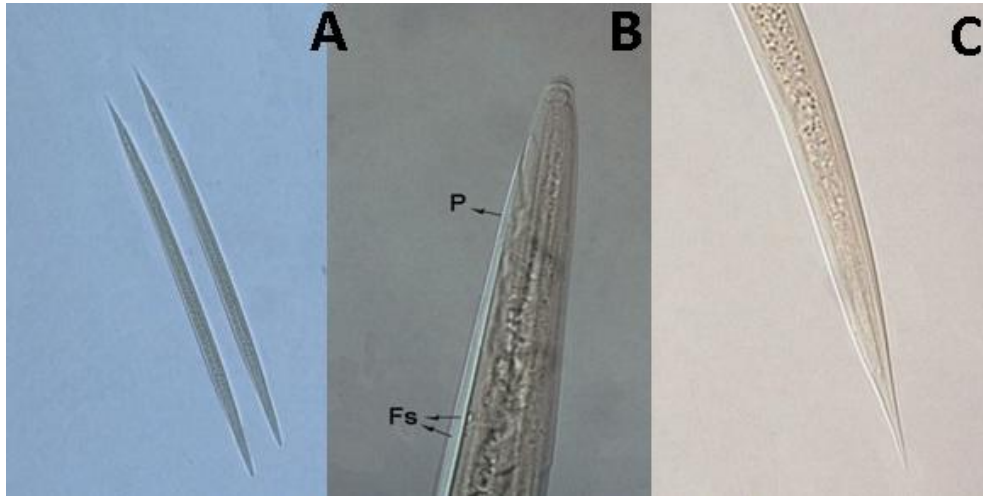
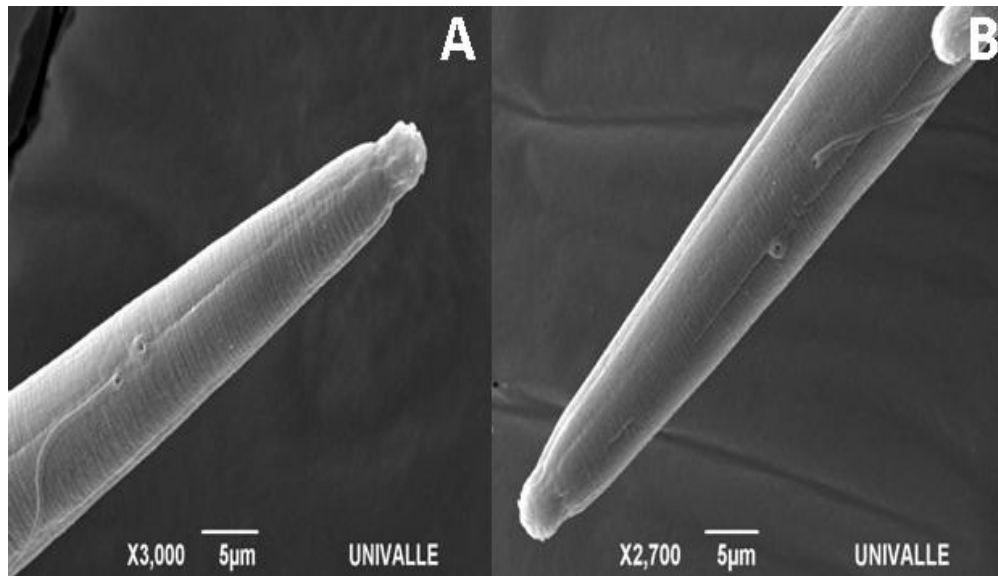


Figura 44. Fotomicrografía de IJs, aislamiento UNPS15. **A.** Longitud total IJs (10x). **B.** Región cefálica, donde se observa el poro excretor y dos fasmidios posterior a este (100x) **C.** Región Caudal (40x). Poro Excretor. FS: Fasmidio.



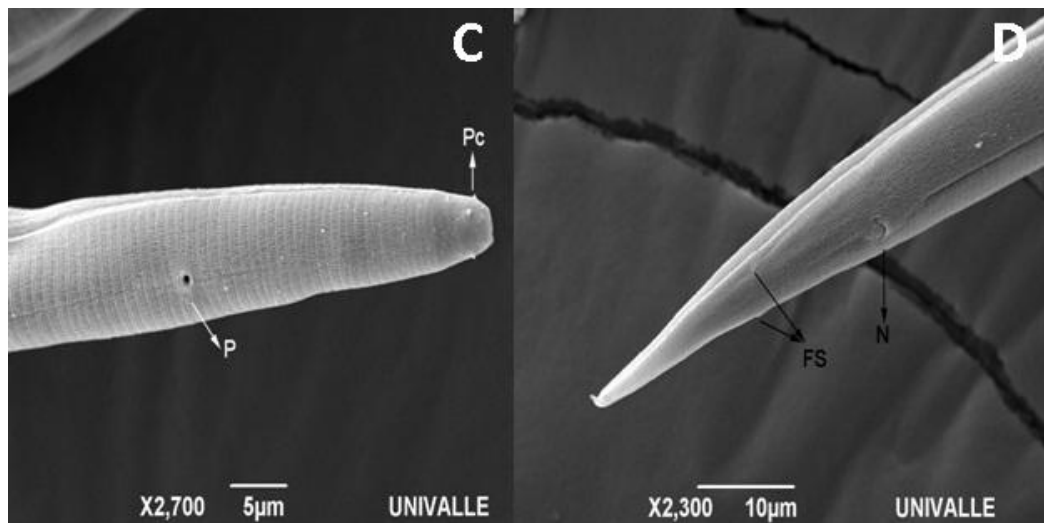


Figura 45. Micrografías electrónicas de Barrido, aislamiento UNPS15. **A -B.** Fasmidios posición posterior al anillo nervioso, especie de nervadura en uno de estos. **C.** Poro excretor. **D.** Región caudal, con fasmidios por debajo del ano. P: Poro excretor. Pc: Papila cefálica.

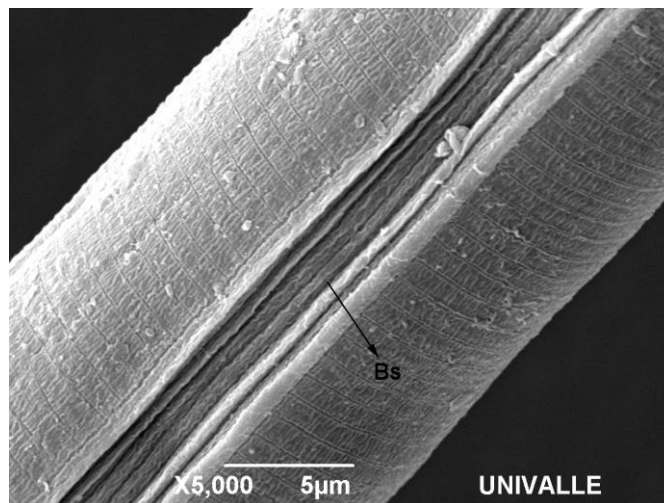


Figura 46. Micrografía electrónica de la región media, IJ aislamiento UNPS15, donde se observa claramente patrón lateral. Bs: Bandas laterales.

8.2.4.3 Hembras de Primera y Segunda Generación

La morfología de las hembras de este aislamiento presentó morfología similar al aislamiento UNPS15 con respecto a la forma de la vulva, con un doble epitigma y unos labios poco sobresalientes, que le dan un aspecto de flor. Anfidelfas con ovarios retroflexos. Con longitud total de 5578 μm en H1G y 909 μm en H2G (Fig. 47). Estoma similar al de los machos, pero con una protuberancia a nivel del poro excretor en H2G (Fig. 48), cola digitiforme en la primera generación y conoide en la segunda, pero ambas con mucrón al

final. Se observa una protuberancia post-anal en ambas generaciones, pequeña en H1G y grande en H2G (Fig. 49). Endotoquia matricida en cada cambio de generación. Vulva con epitigma simple, (Fig. 50) situada en posición posterior a la región media, es decir a un 61% en comparación con la longitud total.



Figura 47. Fotomicrografías hembras del aislamiento UNPS15. **A-B.** Longitud total H1G y H2G (4x).

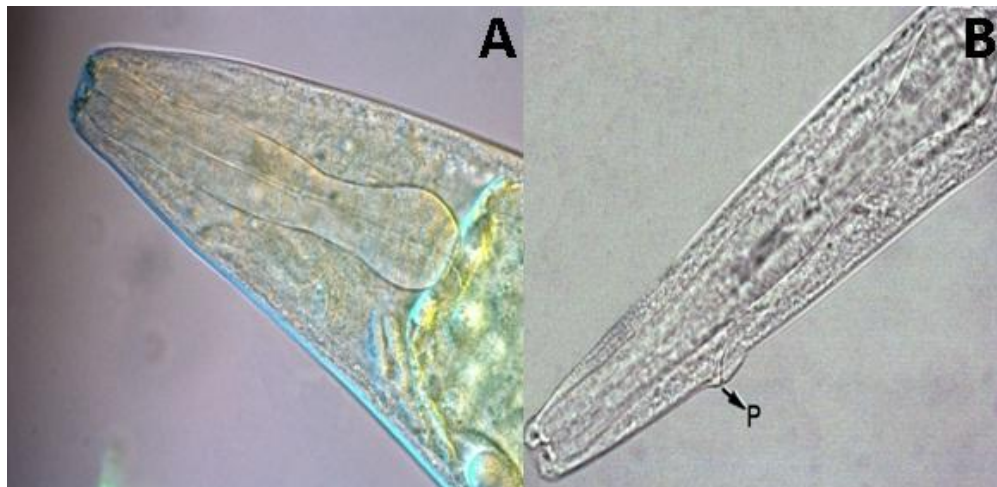


Figura 48. Fotomicrografías región cefálica de hembras del aislamiento UNPS15. **A.** H1G (40x). **B.** H2G (40x).

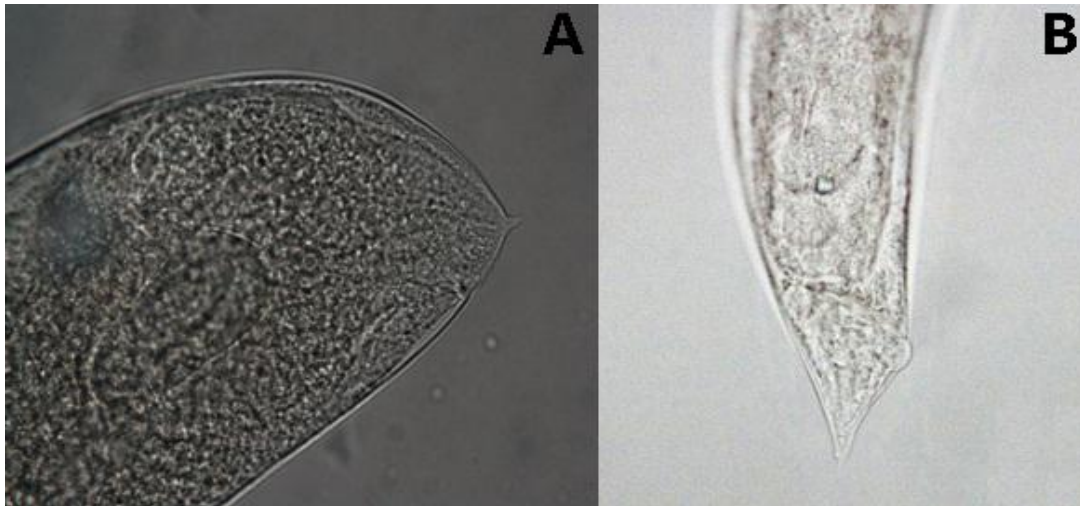


Figura 49. Fotomicrografías de región caudal, hembras aislamiento UNPS15. **A** H1G (40x). **B.** H1G (40X).

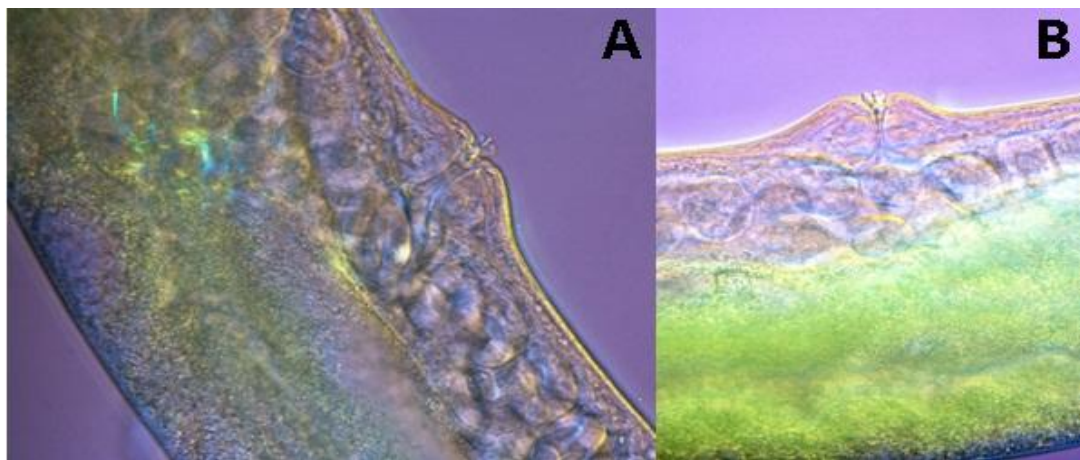


Figura 50. Fotomicrografías de región vulvar, hembras del aislamiento UNPS15. **A.** Vulva con epitigma simple (40x). **B.** Vulva muy protuberante con labios de pequeño tamaño.

Tabla 6. Características Morfométricas de Infeccivos, Machos y Hembras del Aislamiento UNPS15 (Medidas en μm de 25 Individuos de Dos Generaciones). Valores medios \pm La desviación Típica (Rango).

Caracteres/ índices (n=25)	UNPS15				
	J1s X \pm DS (rango)	M1G X \pm DS (rango)	H1G X \pm DS (rango)	M2G X \pm DS (rango)	H2G X \pm DS (rango)
LT	280 \pm 9 264-300	802 \pm 8 786-815	5578 \pm 83 5468-5689	447 \pm 6 435-463	909 \pm 8 890-922

AM	13±0.7 12-14	74±2 67-77	153±19 103-184	25±0.6 24-27	37±1 34-37
LS	-	2±0.2 1-2	4±0.5 3-5	2±0.3 1.2-2.7	2±0.3 2-3
AS	-	3±0.3 3-4	10±0.8 8-11	2.9±0.3 2-3	5±0.2 4-5
LPE	18±0.5 17-19	34±2 28-39	46±3 40-50	26±1 22-29	28±1 26-31
LAN	40±0.8 39-43	51±3 44-59	79±5 70-88	50±3 40-55	56±2 52-64
LBF	60±3 54-67	76±3 62-82	122±7 110-138	69±3 58-75	154±2 146-158
%V	-	-	3458±75 3290-3692	-	510±4 503-521
LRT	-	536±9 515-551		243±2 240-249	-
LC	27±1 22-31	15±0.8 14-18	21±3 19-29	11±0.7 10-12	26±2 23-29
AN	-	26±1 23-30	55±6 44-70	18±1 15-21	19±2 18-28
LE	-	30±1 26-31	-	22±0.2 20-25	-
LM	-	6±0.5 5-7	-	5±0.4 4-6	-
AE	-	6±0.5 5-7	-	5±0.5 4-6	-
LG	-	24±1 23-28	-	19±1 17-21	-
AG	-	3±0.3 3-4	-	3±0.3 3-4	-
LMT	-	0	-	3±0.4 2-4	-
INDICE A	21±1 19-24	0.45±0.04 0.3-0.5	0.37±0.02 0.3-0.4	0,37±0.02 0.3-0.4	0.18±0.009 0.1-0.2
INDICE B	5±0.3 4-5	0,09±0.004 0.08-0.1	0.02±0.004 0.01-0.03	0,15±0.008 0.13-0.16	0.18±0.03 0.1-0.3
INDICE C	10±0.8 9-12	0,01±0.0001 0.01-0.02	0.004±0.0006 0.003-0.005	0,02±0.001 0.021-0.027	0.02±0.003 0.02-0.04
INDICE D	0.30±0.01 0.2-0.3	0,03±0.0001 0.03-0.04	-	0,05±0.003 0.04-0.05	-
INDICE E	0.68±0.06 0.6-0.8	0.13±0.0.01 0.09-0.1	-	0.16±0.03 0.11-0.24	-
INDICE F	0.48±0.04 0.3-0.5	0	-	0,007±0.0009 0.004-0.009	-

INDICE G	-	0,8±0.04 0.7-0.9	-	0,8±0.06 0.6-1	-
INDICE H	-	0,9±0.008 0.7-1	-	1±0.09 0.8-1	-
SW	-	0,03±0.001 0.03-0.04	-	0,05±0.003 0.04-0.05	-

Caracteres: LT: longitud total; AM: anchura máxima; LS: anchura del estoma; LPE: longitud del extremo de la cabeza hasta el poro excretor; LAN: longitud del extremo de la cabeza hasta el anillo nervioso; LBF: longitud del extremo de la cabeza hasta la base de la faringe; LRT: longitud desde el ano al a reflexión del testículo; LC: longitud de la cola; AN: anchura a nivel del ano; LE: longitud de las espículas; LM: longitud de la cabeza de la espícula; AE: anchura de la cabeza de la espícula; LG: largo del gubernáculo; AG: anchura del gubernáculo; LTM: longitud del mucrón; **Índices Machos y Hembras:** A: LPE/LBF; Índice B: LBF/LT; Índice C: LC/LT; Índice D: LE/LT; Índice E: LE/LC; Índice F: LTM/LT; Índice LG/LE; Índice H: LE/AN; SW: LE/LT **Índices IJs:** Índice A: LT/AM; Índice B: LT/LAN; Índice C: LT/LC; Índice D: LS/ LAN; Índice E: LS/LC; Índice F: AM/LC

9. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLAMIENTOS

La importancia de realizar el estudio del ciclo de vida de los nemátodos nativos, radica en conocer la habilidad de los juveniles infectivos para descubrir y penetrar el hospedero. Información necesaria en la aplicación de estos NEPs nativos un plan integrado de manejo de insectos plaga. Con relación al ciclo biológico, los aislamientos estudiados presentaron un período de vida similar al descrito para otras especies de Steinernemátidos (Wouts, 1980; Doucet *et al.*, 1996; Stock, 1998; Sáenz, 2000), con un periodo largo para los cuatro aislamientos, al generarse dos generaciones de adultos, pero con diferencias en el número de días, siendo mayor para UNPS12-UNPS15 y menor en UNP13-UNPS14. Se observó además, que la temperatura óptima de desarrollo y reproducción de los aislamientos nativos estuvo en un rango superior a 24°C con un promedio de 28°C, similar a la especie *S. feltiae* que parte desde 28°C hasta 32°C (Molyneux, 1985; Poinar, 1990; Zervos, 1991; Sáenz, 2000) condiciones favorables para varias generaciones de adultos en los cadáveres infectados.

En cuanto a la coloración de los insectos parasitados, esta fue similar (amarillo ocre), pero con un tono más intenso en un solo aislamiento (UNPS13), esto se explica, en que según algunos estudios realizados con relación al complejo nematodo - bacteria (Boemare y Akhurs, 1988; Susurluk *et al.*, 2001; Hazir *et al.*, 2004, Adams *et al.*, 2006). El pigmento y la manifestación del color son variables según las cepas de bacterianas, ya que cada especie de nematodo tiene una asociación natural con una sola especie de bacteria, dando lugar a la aparición de diferentes fenotipos, más o menos pigmentados.

Por otra parte, el estudio de los caracteres morfométricos de los aislamientos, diversifica los rangos conocidos para las especies del género *Steinernema* establecidos por Nguyen (2007) y otros autores (Doucet y Doucet, 1990; Nguyen y Smart, 1996; Stock y Kaya, 1996), en particular: longitud total, longitud del extremo anterior al poro excretor, al anillo nervioso y al bulbo basal, longitud de la cola, de la espícula, gubernáculo e índices respectivos en cada uno de los estadios. Las diferencias más relevantes se observaron el tamaño de los infectivos de UNPS12 (304 µm) - UNPS15 (280 µm), los cuales se encontraron por debajo de lo establecido (<600 µm en un rango de 510 µm - 589 µm), imposibilitando su asociación con especies

descritas. A pesar de ello, estos aislamientos, al igual que UNPS13 (568 μm) - UNPS14 (552 μm) permite agruparlos inicialmente dentro del grupo *Carpocapsae*, con la excepción de UNPS13 que por sus características morfológicas, presenta en su región cefálica estructuras en forma de cuerno, ubicándose en el grupo *Bicornutum* (Nguyen, 1999; Spiridonov *et al.*, 2004) compuesto por *S. ceratophorum* (Jian *et al.*, 1997), *S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994; Nguyen y Adams, 2003), *S. bicornutum* (Tallosi *et al.*, 1995), *S. abbasi* (Elawad *et al.*, 1997; Nguyen y Adams, 2003) y *S. pakistanense* (Shahina *et al.*, 2001; Stock *et al.*, 2001). Estas estructuras en la región cefálica de los infectivos juveniles, es considerada un carácter compartido – derivado de un ancestro común (Stock *et al.*, 2001).

Según lo anterior, UNPS13 difiere de las especies de este grupo, en la longitud promedio del cuerpo de los IJs 568 μm (520 μm -630 μm), PE de 40 μm , índices %D de 50, G de 0.9 μm (0.7 μm -1 μm) y espículas de longitud (LE) de 58 μm (45 μm -66 μm). Sin embargo, se encontró una alta similitud morfométrica y morfológica con *S. abbasi* (Cabanillas *et al.*, 1994; Nguyen y Adams, 2003), que se ve relacionada con la longitud de sus IJs. Estos se hayan un rango de 496 μm - 579 μm , LE de 57 μm - 74 μm , cabeza de la espícula, con proyección ventral con terminación en punta, eje casi ausente, gubernáculo largo en relación a la espícula (índice G: 70%). Cabe denotar que la diferencia del aislamiento con *S. abbasi* se encuentra en que los machos de UNPS13 si presentan mucrón (M1G: 3 μm , M2G: 1 μm) y los de esta especie no.

En cuanto a los aislamientos UNPS12, UNPS14 y UNPS15, de manera general, estos no presentan características morfométricas que permita relacionarlos con las especies descritas actualmente (Nguyen, 1993, Stock *et al.*, 2001). Esto se ve muy marcado el tamaño de los infectivos juveniles (UNPS12) y la longitud de espículas (UNPS14 y UNPS15).

Efectivamente, se reporta para los machos de estos aislamientos longitud variable, M1G en el orden de UNPS12 (1664 μm), UNPS14 (824 μm), siendo los de menor tamaño los de UNPS15 (802 μm); espículas amarillas, con longitud para UNPS12 de 60 μm (57 μm - 66 μm), UNPS14 con 32 μm (29 μm -34 μm) y UNPS15 de 30 μm (26 μm -31 μm); manubrios redondos en UNPS12-UNPS15, cuadrangular en UNPS14; todas con depresión ventral, con velo en todos casos (Nguyen, 1993). Gubernáculos cortos con un índice G: 80% en todos los casos. Colas largas en relación con la longitud del cuerpo de 60% para UNPS12 - UNPS14 y 70% solo en UNPS15, todos con

anillo nerviosos por encima del metacarpus. En cuanto a la morfometría de las hembras, la posición de la vulva en proporción a la longitud media, fue similar para UNPS13 – UNPS14 ubicada en un 41% y UNPS12 –UNPS15 en un 60% del extremo cefálico, pero diferente en su morfología, ya que UNPS12 y UNPS13 no presentan doble o epitigma sencillo, sino unos labios prolongados (Poinar, 1993; Stock, 1996; Doucet *et al.* 1996).

El estudio morfológico y morfométrico no permitió agrupar los cuatro aislamientos como una sola especie. Además, las similitudes encontradas en el aislamiento UNPS13 con relación a la especie *S. abassi*, no coinciden su totalidad, pues existieron unas pocas características que no se ajustaron a esta. Según lo anterior, y su comportamiento biológico, el presente estudio permitió asumir que los aislamientos evaluados corresponden a especies diferentes.

10. CONCLUSIONES

La necesidad de encontrar nuevas especies de nemátodos lleva consigo la necesidad de caracterizar morfológicamente los nuevos aislamientos con apoyo en microscopía de luz y electrónica de barrido. La integración de estas dos técnicas de microscopía permitió observar la similitud y las diferencias en la morfología de los diferentes aislamientos, lo que las convierte en herramientas útiles para la caracterización de aislamientos nativos.

Con relación a la biología básica de los aislamientos, estos presentaron diferencias en su comportamiento biológico, lo cual permite asumir inicialmente que se tratan de aislamientos diferentes.

También, mediante los estudios de morfología y morfometría se logró determinar que existen diferencias importantes entre los cuatro aislamientos (UNPS12, UNPS13, UNPS14 y UNPS15), por lo que se consideró que pertenecen a especies diferentes. Esa diferencia se vio muy marcada en las espículas, carácter primordial de identificación.

Cabe notar, que las investigaciones basadas en la biología, ecología, patogenicidad, y la búsqueda de especies nativas, ofrecen información importante en la creación de metodologías que sirvan para la regulación poblacional de insectos plaga. Los resultados presentados con relación al ciclo biológico, sirven de partida para el desarrollo de metodologías de multiplicación de los aislamientos nativos sobre *D. saccharalis*.

Los nemátodos entomopatógenos nativos del presente estudio, pueden contribuir en la reducción de la población del barrenador *D. saccharalis*.

11. LITERATURA CITADA

- ADAMS, B. J., FODOR, A., KOPPENHÖFER, H. S., STACKEBRANDT, E., STOCK S. P., KLEIN MG. 2006. Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens *Biological Control* (37) 32–49 pp.
- ADAMS, B. J., NGUYEN, K. B. 2002. Taxonomy and systematic. In: *Entomopathogenic Nematology*. R. Gauler (Ed.). CABI Publishing. 1-33 pp.
- AKHURST, R.J. 1990. Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In: Laird M, Lacey LA, and Davidson EW. eds. *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press. Boca Raton, FL; 233-240 pp.
- AMARASHINGE, L. D., HOMINICK, W. M., BRISCOE, B. R., REID, A.P. 1994. Occurrence and distributions of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *Journal of Helminthology* 68, 277-286 pp.
- BALIADI, Y. 2004. Evaluation of nematicidas for control of peanut parasitic nematodes. National Agricultural Library, USDA (United States of America). ISSN: 0361-5804. Vol. 948. 76-80 pp.
- BAUER, M.E., KAYA H.K. 2001. Persistence of entomopathogenic nematodes. *Bulletin from Regional Project S-265*, <http://www.agctr.lsu.edu/s265/>.
- BAKER, G.L., CAPINERA, J. H. 1997. Nematodes and Nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. *Memoriors of the Entomological Society of Canada*. 171, 157-211pp.
- BEDDING, R. A. 1998. Future possibilities for using Entomopathogenic nematodes. *Japanese. Journal of Nematology*. 28:12, 46-60 pp.
- BEGLEY, J.W. 1990. Efficacy against insects in habitats other than soil. *En Entomopathogenic nematodes in biological control*, Boca Raton. FL.: CRC Press.

- BIRD, A. F., AKHURST, R. J. 1983. The natural of intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal Parasitology*. 13, 599-606 pp.
- BOEMARE, N. E., AKHURST, R. J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology*. 134, 1835-1845 pp.
- BOEMARE, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R. ed. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing. Wallingford, UK. 35-56 pp.
- BONET T. 1997. Hongos entomopatogenos de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) en Puerto Rico. M.S. dissertation, University of Puerto Rico, Mayaguez (Puerto Rico), United States -- Puerto Rico. Retrieved January 29, 2010, from Dissertations y Theses: AYI.(Publication No. AAT 1386645).
- BROWN, I.M., GAUGLER R. 1996. Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *Journal of Thermal Biology*. 21:115-121 pp.
- BURNELL, A. M., STOCK S.P. 2000. Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. *Nematology* 2:1, 31-42 pp.
- CABANILLAS, H. E., POINAR, G. O., RAULSTON, J.R. 1994. *Steinernema riobrave* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundamental and Applied Nematology*. 17:2, 123-131 pp.
- CAICEDO, A.M. y BELLOTTI, A.C. 1994. Evaluation of the potential of the entomogenous nematode *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) for the control of *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) under laboratory conditions. *Revista Colombiana de Entomologia*, 20(4): 241-246 pp.
- CAICEDO, A. M. y A. BELLOTI. 1996. Reconocimientos de nematodos entomopatogenos nativos asociados con *Cyrtomenus bergi* Froeschner

- (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 22(1): 19-24 pp.
- CICHE, T.A.; ENSIGN J.C. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1890-1897 pp.
- CURRAN, J. y ROBINSON, M. P. 1993. Molecular aids to nematode diagnosis. In *Plant Parasitic nematodes in temperate agriculture*. CAB International, Willingford, UK, 545-564 pp.
- De DOUCET, M. A. A. 1986. A new species of *Neoplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Rhabditida) from Córdoba, Argentina. *Revue de Nématologie*. 9:4. 317-323 pp.
- De DOUCET, M. A. A., y DOUCET, M. E. 1990. *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica*. 36, 257-265 pp.
- Del POZO, N., ELIO, M. 2000. Los nematodos entomopatógenos y su uso en el control biológico. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana.
- DOLINSKI, C., KAMITANI F., MACHADO R. I., WINTER C. E. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from tropical rainforest in Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 103(2) :150-159 pp.
- EBSSA E., EHLERS R., POEHLING, H., GAIGL, A., BORGEMEISTER, C. 2004. Interactions between host plants, the subterranean burrower bug, *Cyrtomenus bergi*, and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Nematology* 6 (5): 633-639 pp.
- ELAWAD, S., AHMAD, W., REID, A. P. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundamental and Applied Nematology*. 20:5. 435-442.
- FERNÁNDEZ, E., ARTEAGA, E., PEREZ, M. 1995. Utilización de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas Agrícolas. En <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm> (2005).

- FILIPJEV, I. N. 1934. The classification of the free-living nematodes and their relation to parasitic nematodes. *Smithson Misc. Coll.* 89: 1-63 pp.
- FORST, S., CLARKE, D. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. *Entomopathogenic Nematology*. New York CABI Publishing, 2002. 55-77 pp.
- FLORES, V. 1998. Evaluación in vitro de los nematodos Entomopatogenos *Heterorhabditis indicus* cepa 21, *Heterorhabditis indicus* cepa 63 y *Steinernema puertoricensis* para el control de *Alphitobius diaperinus*. M. S. dissertation, University of Puerto Rico, Mayaguez (Puerto Rico), United States -- Puerto Rico. Retrieved January 29, 2010, from Dissertations y Theses: A&I. (Publication No. AAT 1391371).
- GARZÓN, M., AZA, B., JIMENEZ, J., LUQUE, J. 1996. Potencial del nematodo *Steinernema* sp para el control biológico del gusano blanco de la papa. *Revista Colombiana de Entomología*. 22:1, 25-30 pp.
- GAUGLER, R., WANG, Y., CAMPBELL, J. F. 1994. Aggressive and evasive behaviours in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabeidae) larvae: defensive against entomopathogenic nematodes attack. *J. Inv. Pathol.*, 64: 193-199 pp.
- GEORGIS, R., KAYA, H. K., GAUGER, R. 1991. Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Environmental Entomology*. 20, 815-822 pp.
- GLASER, R. W. 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*), New Jersey. *Departamento de Agricultura*. 211, 34 pp.
- GLASER, R. W., FARRELL, C.C. 1935. Field experiments with the Japanese beetle and its nematode parasite. *Journal of the New York Entomological Society*. 43, 345-371 pp.
- GLAZER, I. 1991. Ecological considerations for Entomopathogenic nematodes activity under sub-optimal conditions. *Procc. third European Meeting "microbial control of pests" IOBC-OILB. Wageningen*. 28-31 pp.

- GÖTZ, P., BOMAN, H. G. 1981. Interactions between insect immunity and an insect- pathogenic nematode with symbiotic bacteria. Proceedings of the Royal Society . B. 212: 333-350 pp.
- GREWAL, P. S., SELVAN, S., GAUGLER, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal of Thermal Biology. 19: 245-253 pp.
- GREWAL, P. S., GEORGIS, R. 1999. Entomopathogenic nematode. En F. R. Hall y J.J. Menn. (Eds), Methods Biotechnology. Biopesticides: Uses and Delivery. Totowa, New Jersey: Humana Press INC. 271-299 pp.
- GRIFFIN, C.T. 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. In: Bedding R, Akhurst R and Kaya HK. Eds. Nematodes and the Biological Control of Insects. CSIRO Publications. East Melbourne, Australia; 115-126 pp.
- HARA, A. H., KAYA, H. K. 1982. Effects of selected insecticides and nematicides on the vivo development of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. Journal of the Nematology. 14:4, 486-491 pp.
- HAZIR, S., STOCK, S. P., KAYA, H. K. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of the Invertebrate Pathology. 77: 243-250 pp.
- HAZIR, S., KAYA, H.K., STOCK, P., KESKIN, N. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. Turk J Biol 27 181-202.
- HIRSCHMAN, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: N. J. Sasser, and C.C. Carter (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne* Biology and Control. Raleigh, North Carolina, USA. Vol. II. 79-93 pp
- HOMINICK, W. B. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: protocols and , 271-298 pp.

- JENKINS, D., SHAPIRO-ILAN, D., y GOENAGA, R. 2008. Efficact of Entomopathogenic Nematodes versus *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) Larvae In A High Clay-Content Oxisol Soil: Greenhouse Trials With Potted Litchi *Chinensis*. *The Florida Entomologist*, 91(1), 75-78. Retrieved February 16, 2010, from ProQuest Biology Journals. (Document ID: 1458906051).
- JIAN, H. 1997. *Steinernema ceratophorum* n.sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from north-east China. *Systematic Parasitology*. 37: 115-125 pp.
- JOHNIGK, S. A., EHLERS, R. U. 1999. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. inca* (Nematode: Heterorhabditidae). *Nematology* 1: 717-726 p.
- KAYA, H. K., GAUGLER R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review Entomology*. 38: 181-206 pp.
- KAYA, H., STOCK, S. 1997. Techniques in insect nematology, pp. 281-324. En: Lacey, L. A. (ed.). *Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques*. Academic Press, Inc. San Diego. Chap. 6.
- KAYA, H.K., KOPPENHÖFER, A.M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*. 6: 333-345 pp.
- KLEIN, M. G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insects pest. En *Entomopathogenic nematodes in biological control*, Boca Raton. FL.: CRC Press. 195-214 pp.
- KOPPENHÖFER, A.M., KAYA, H.K., TAORMINO, S. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *J. Inverteb. Pathol.* 65: 193- 199 pp.
- KOZODOI, E. 1984. A new entomopathogenic nematode *Neoaplectana anomali* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) and observations on its biology. *Zool. Zhur.* 63: 1605 p.
- LACEY, L.A., GOETREL, M. S. 1995. Current development in microbial control of insect pest and prospects for the early 21st century. *Review. Entomophaga*. 40:1. 3-27 pp.

- LIU, J., BERRY, R. E. 1996. *Steinernema oregonensis* sp. n. (Rhabditida: Herorhabditidae) from Oregon, EE.UU. *Fundamental and Applied Nematology*. 19, 375-380 pp.
- LIU, J., BERRY, R. E. 1995. Natural distributions of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Herorhabditidae and Steinernematidae) en Oregon soils. *Environmental Entomology*. 24:1, 159-163 pp.
- LONG, K., SPIRIDONOV, E., SUBBOTIN, A., Moens, M. (2005); Four new species Of *Steinernema* Travassos, 1928 With Short Infective Juveniles from Vietnam. Institute of Parasitology of Russian Academy of Sciences, Leninskii prospect 33, Moscow, 119071, Russia.
- LÓPEZ-NÚÑEZ, J. C., CANO, L., GÓNGORA-B, C. y STOCK, S. P. 2007. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology* Vol. 9(3), pp. 333-341 pp.
- MAMIYA, Y. 1998. *Steinernema kshidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabeida beetle larvae from Sjihizuoka Japan. *Applied Entomology and Zoology*. 23: 313 -320 pp.
- MRÁČEK, Z., ARTEAGA, H. E., BOEMARE, N.E. 1994. *Steinernema cubanna* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. *Journal Invertebrate Pathology*. 64, 123-129 pp.
- NGUYEN K. B., SHAPIRO-ILAN D. I., STUART R. J., MCCOY C. W., JAMES R. R., ADAMS B. J. 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* 6: 231-244 pp.
- NGUYEN, K. B; SMART, G. C. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*. 22:2, 187-199 pp.
- NGUYEN, K. B., SMART, G.C. 1992. *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and new a key to species of the genus *Steinernema*. *J. Nematol.* 24:4, 463-477 pp.

- NGUYEN, K. B., SMART, G.C. 1994. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasitic of the termite *Reticulitermis flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*. 26:2, 162-174 pp.
- NGUYEN, K. B., SMART, G. C. 1993. Location of the phasmids on infective juveniles of *Steinerinema glasseri*. *Journal of Nematology*. 25:4, 625-627 pp.
- NGUYEN, K. B., HUNT, D. J., MRACEK, Z. 2007. Entomopatogenic nematode: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. *Nematology Monographs and Perspectives*. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands. Capítulo 4. Steinernematidae. Species descriptions.
- OLAYA, G. 2008. Reconocimiento y aislamiento de nematodos entomopatógenos nativos en la zona rural de Buenaventura-Valle del Cauca. Tesis para optar al título de Agronomía del Trópico Húmedo. Universidad Del Pacífico-Buenaventura. 30 pp.
- ORTIZ, L. E. 1994. Control microbiano de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterigidae) con el nematodo *Steinerinema carpocpsae* en Tumaco (Nariño). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. 97 pp.
- PHAN, L. K., NGUYEN, C. N., MOENS, M. 2003. *Herorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Herorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*. 5:3, 367-382 pp.
- PETERS, A. 1996. The natural host range of *Steinerinema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 389-402 pp.
- PARDO LOCARNO LC., CONSTANTINO LM., AGUDELO R. Y CAICEDO B. 1997. Complejos entomológicos del chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K.) en el Bajo Anchicayá, Valle. En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), 24 Pereira. Resúmenes, Pp: 78.
- PATEL, M.N., PERRY, R. N., WRIGHT, D.J. 1997. Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinerinema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Int. J. Parasitol.* 27: 61–70 pp.

- PHAN, K. L., NGUYEN, N.C., MOENS, M. 2001. *Steinernema sangi* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. Russian Journal of Nematology. 9:1. 1-7 pp.
- PHAN, K. L., NGUYEN, N.C., MOENS, M. 2001. *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. Nematology. 3:6. 503-514.
- PIEDRAHITA, C. y VÉLEZ, C. 1986. Métodos de obtención y conservación de las harinas del chontaduro, *Bactris gasipaes* H.B.K. En: Universidad Nacional de Colombia, Seminario sobre recursos vegetales promisorios 3, Medellín. Memorias. pp. 142-157 pp.
- POINAR, G.O. 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). Nematologica 12: 105-108 pp.
- POINAR, G.O. 1985. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoplectana carpocapsae* in the field. Journal Nematology. 18 (1): 34-36 pp.
- POINAR, G. O. 1975. Entomogenous nematodes. A manual and host list of insect-nematode associations. E.J. Brill, Leiden, The Netherlands. 317 pp.
- POINAR, G. O. 1979. Nematode for Biological Control of Insects. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida. 277 pp.
- POINAR, G. O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Herorhabditidae. En: Entomopathogenic nematodes in biological control. Editado por R. Gaugler y H. K. Kaya. CRC Press. Florida. pp. 23-6.1
- POWELL, J.R., WEBSTER, J.M. 2004. Target host finding by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the presence of a non-target insect host. Journal Nematology. 36: 285-289 pp.
- ROMAN, J., FIGUEROA, W. 1994. *Steinernema puertoricensis* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. Journal Agricultural of University Puerto Rico. 78, 167-175 pp.

- ROSADO, Y. 2005. Efecto de prácticas agrícolas sustentables en el manejo de nematodos fitoparasitarios en calabaza (*Cucurbita moschata* Dutch.). M.S. dissertation, University of Puerto Rico, Mayaguez (Puerto Rico), United States -- Puerto Rico. Retrieved February 16, 2010, from Dissertations & Theses: A&I.(Publication No. AAT 1427049).
- ROVESTI, L., HEINZPETER, W., TAGLIENTE, K., DESEO, K. V. 1998. Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. *Nematologica*, 36: 462-476 pp.
- ROVESTI, L., DESEO, K.V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 36: 237-245 pp
- RUPERT, E. E., BARNES, R. D. 1996, Zoología de los invertebrados, 5ta edición, Interamericana, México D.F. 1140 pp.
- SÁENZ, A.A. 1998. *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae): ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Tesis M.Sc. en Entomología. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Bogotá. Bogotá (Colombia). 130 p.
- SÁENZ, A.A., LUQUE, J.E. 2000. Ciclo de vida del entomonematodo nativo *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Bogotá. *Revista Agronomía Colombiana*. 17, 17-24 pp.
- SEINHORST, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin, *Nematologica* 4: 117–128 pp.
- SHAPIRO, D. I., GAUGLER, R. 2002. Production technology from entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28, 137-146 pp.
- SHEN, C.P., WANG, G. H. 1992. Description and studies of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. n. Proceeding of the First National Academic Symposium. Chinese Science and Technology, Press. Beijing, China. 220-23 pp.
- SMART, G.C., NGUYEN, K.B. 1994. Role of entomopathogenic nematodes in biological control. En D. Rosen, F. D. Bennett, y J. L. Capinera (Eds).

- Pest management in the subtropics: Biological control – a Florida perspectiva. UK, Andover Intercept. 231-2529 pp.
- SOUTHEY, J. F. 1970. Laboratory methods for work plant and soil nematodes. Ministry of agriculture, Fisheries and Food. Technical Bull. 2. London: Her Majesty's Stationery Office.
- STEINER, G. 2003. *Aplectana kraussei* n. sp., einer in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkunge über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden. Zentral. Bakteriolog. Parasiten Infekt. Hyg. Abt. 59:14-18 pp.
- STEINER, G. 1929. *Neoplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) a new nemec parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newn). Journal of the Washington Academy Sciences. 19:436-440 pp.
- STOCK, S. P., CHOO, H. Y., KAYA, H. K. 1997. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. Nematologica. 43: 15-49 pp.
- STOCK, S. P., SOMSOOK, V., REID, A. P. 1998. *Steinernema siamkayai* sp. n (Rhabditida: Steinernematidae) an entomopathogenic nematode from Thaily. Sistematic Parasitology. 41. 105-113 pp.
- STOCK, S. P., CAMPBELL, J. F., NADLER S A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred from Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. Journal of the Parasitology, Vol. 87, No. 4, pp. 877-889 pp.
- STOCK, S. P., GRESS, J. C 2006. Diversity and phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of southern Arizona, Journal of the Invertebrate Pathology. 92: 66–72 pp.
- TALLOSI, B., PETERS, A., EHLERS, R. 1995. *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. Russian Journal or Nematology. 3:2, 71-80 pp.

- WANG, Y., GAUGLER, R. 1998. Host and Penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. *Journal of the Invertebrate Pathology*. 72: 131-318.
- WATURU, C. D., HUNT, D. J., REID, P. 1997. *Steinernema kariii* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Kenya. *International Journal of Nematology*. 7: 68-75 pp.
- WOODRING, L., KAYA, H. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Stations. Fayetteville, Arkansas, USA. 1-29 pp.
- YAMILKA, P., MARQUEZ, G. Caracterización de la Fase Primaria de los nematodos Entomopatógenos *Steinernema cubanum*, *Heterorhabditis indica* y *H. bacteriophora*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. FITOSANIDAD. Vol 10. La Habana. 2006
- ZERVOS, S., JHONSON, S. C., WEBSTER, J. M. 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Canadian Journal Zoology*. 69, 1261-1264 pp.