

**Evaluación de cuatro formulaciones para el  
almacenamiento del nematodo  
entomopatógeno *Heterorhabditis  
bacteriophora* en dos estados de actividad**

**Ian Ucan Yam**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**  
Noviembre, 2016

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de cuatro formulaciones para el  
almacenamiento del nematodo  
entomopatógeno *Heterorhabditis  
bacteriophora* en dos estados de actividad**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Ian Ucan Yam**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2016

## **Evaluación de cuatro formulaciones para el almacenamiento del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* en dos estados de actividad**

**Ian Ucan Yam**

**Resumen.** Para el almacenamiento de nematodos entomopatógenos se requiere formulaciones estables que puedan mantener la viabilidad de los nematodos antes de ser aplicados. Existen formulaciones en vermiculita, esponja, polvo mojable y gránulos dispersables que requieren refrigeración para inducir a una latencia parcial y mantener su viabilidad. En el estudio se evaluó la mortalidad del nematodo entomopatógeno (*Heterorhabditis bacteriophora*) en cuatro formulaciones utilizando nematodos en estado activo y latente los cual fueron almacenados a 20°C. Se determinó la infectividad de estos nematodos en larvas de *Galleria mellonella* a 7, 14 y 21 días después de ser almacenados. Los nematodos almacenados a 20°C en estado latente presentaron menor mortalidad en las cuatro formulaciones evaluadas. La formulación en esponja con nematodos en estado latente tuvo la menor mortalidad y no se observó diferencia significativa en estado activo. Las formulaciones en estado de latencia presentaron menor mortalidad lo que significa que inducir a los nemátodos en un estado parcial de latencia redujo el porcentaje de mortalidad para todas las formulaciones. El porcentaje de infectividad fue indirectamente proporcional a la mortalidad en todas las formulaciones solamente a los 21 días después del almacenamiento. El estado de actividad no afectó la infectividad a los 7 y 14 días.

**Palabras clave:** Anhidrobiosis, control biológico y deshidratación

**Abstract:** For storage of entomopathogenic nematodes it requires stable formulations that will maintain the viability of nematodes before application. There are formulations based on vermiculite, sponge, wettable powder, and dispersible granules that require refrigeration to induce a partial latency and maintain its viability. In this study it was evaluated the mortality of entomopathogenic nematode (*Heterorhabditis bacteriophora*) in four formulations using active and dormant state nematodes which were stored at 20°C. Infectivity of nematodes was determined in *Galleria mellonella* larva's on the 7, 14 and 21 days after being stored. The results indicate that the nematodes stored at 20°C in latent state had a lower mortality rate in the four evaluated formulations. The sponge formulation with nematodes in dormant state had the lowest mortality and had no significant difference was observed in the active state. Formulations in dormant state showed lower mortality meaning that inducing nematodes in a partial state of dormancy had a positive effect on mortality for all formulations. The infectivity percentage was indirectly proportional to mortality in all formulations only at 21 days after storage. The activity status did not affect percentage of infectivity at 7 and 14 days after storage.

**Key words enzymatic** Anhydriobiosis, biological control and dehydration.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4 CONCLUSIONES.....</b>	<b>14</b>
<b>5 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>15</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>16</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>18</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Formulaciones utilizadas para el almacenamiento de nematodo entomopatógeno. ....	3
2. Cuatro formulaciones utilizadas con porcentajes de humedad inicial, final y tiempo para inducir a un estado de latencia al nematodo entomopatógeno, <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> . ....	6
Figuras	Página
1. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad medida a los 7 días después de almacenados a 20°C. ....	8
2. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad medida a los 14 días después de almacenados a 20°C. ....	9
3. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad medida a los 21 días después de almacenados a 20°C. ....	10
4. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones y dos estados de actividad a los siete días después de la elaboración a 20°C. ....	11
5. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones y dos estados de actividad a los 14 días después de la elaboración a 20°C. ....	12
6. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad a los 21 días después de la elaboración a 20°C. ....	13
Anexos	Página
1. Formulaciones para el almacenamiento de diferentes nematodos y la vida anaquel a diferentes temperaturas. ....	18
2. El movimiento de los nematodos a diferentes temperaturas. ....	19

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de insecticidas químicos favorece el desarrollo de resistencia en los insectos y tiene efectos adversos sobre los insectos benéficos, medio ambiente y la salud humana. A pesar de su alta eficiencia en el control de plagas, su gran impacto al medio ambiente ha causado una necesidad de reducir su participación dentro del control de plagas y recurrir a la búsqueda de mejores estrategias con menor impacto ambiental tales como controles culturales y biológicos (Sáenz A. 2005). El control biológico consiste en la utilización intencional de enemigos naturales para regular las poblaciones de organismos que alcanzan el nivel de plaga. Las ventajas del control biológico incluye ningún riesgo a la salud pública y no causa contaminación ambiental (Hanson 1993). Un ejemplo del control biológico de plagas son los nematodos entomopatógenos que tienen un efecto a largo plazo sobre la población de la plaga, son seguros para el usuario y el ambiente (Ralf-Udo 2001).

Los nematodos entomopatógenos más estudiados pertenecen a la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae cuyos miembros están mutualísticamente asociados con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Sáenz A. 2005). El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* ha formado una relación simbiótica con la bacteria *Photorhabdus luminescens*. Esta bacteria tiene la capacidad de matar al insecto en 24–48 horas. Los nematodos entomopatógenos ingresan a los insectos a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) llegando hasta el hemocele, una vez dentro del insecto vomitan la bacteria y sus metabolitos que provocan una septicemia al insecto causándole la muerte. La bacteria produce antibióticos que inhibe el crecimiento de otras bacterias y sus subproductos proveen al nematodo los compuestos necesarios para su desarrollo (Cano et al. 2004).

La tecnología de aplicación es crítica para el éxito de los nematodos entomopatógenos como controlador biológico (Grewal et al. 2005). El pobre almacenaje y sobrevivencia posaplicaciones son los mayores obstáculos para expandir el uso de nematodos entomopatógenos como bioinsecticidas (Gaugler 2002). Para la producción y almacenamiento de nematodos entomopatógenos se requiere de equipos sofisticados y formulaciones apropiadas para almacenamiento pero es necesario la refrigeración para mantener su efectividad (Campos-Herrera 2015).

Es difícil obtener una formulación para cada especie y la necesidad de refrigeración limita su disponibilidad a pequeños agricultores, lo que causa mayor uso de químicos para control de plagas. El concepto general de las formulaciones de nematodos es similar que cualquier pesticida químico pero los nematodos presentan unos retos únicos. El objetivo principal de una formulación es la estabilidad de almacenamiento, facilidad de transporte

y uso. El mantener una viabilidad durante y después de la aplicación es fundamental para cualquier formulación exitosa (Gaugler 2002). La demanda de oxígeno y susceptibilidad a contaminación microbiológica limitan las formulaciones sólidas y semi-sólidas. Actualmente se han desarrollado formulaciones a base de vermiculita, gel, concentrados líquidos, polvos mojable, esponjas y gránulos dispersables en agua. La mayoría de las formulaciones se basan en el principio de conservar los nematodos, limitando su gasto, a través de restringir la energía gastada en el movimiento o reduciendo el consumo de oxígeno induciendo a un estado parcial de anhidrobiosis (Grewal y Ramon 1999).

El objetivo de esta investigación fue evaluar cuatro formulaciones para el almacenamiento de nematodos entomopatógenos a 20°C, induciendo los nematodos en dos estados de actividad sobre la mortalidad y la infectividad a los 7, 14 y 21 días después de almacenados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** La investigación se llevó a cabo de mayo a septiembre del 2016 en el laboratorio de control biológico en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, ubicada en el Valle del Yeguaré. La temperatura en el laboratorio fue de 25°C durante la investigación.

**Descripción de los Ensayo.** La investigación se realizó en cuatro fases: la primera fase fue la producción *in vivo* de nematodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora* utilizando larvas de *Galleria mellonella*. La segunda fase fue la preparación de las cuatro formulaciones para el almacenamiento del nematodo. La tercera fase fue la evaluación de la mortalidad a través del conteo de los nematodos vivos y muertos de las formulaciones a los 7, 14 y 21 días después de la elaboración. La cuarta fase consistió en la evaluación de la infectividad de los nematodos a los 7, 14 y 21 días después de la elaboración de las formulaciones utilizando larvas de *Galleria mellonella* para infectar.

**Material Biológico.** Los nematodos entomopatógenos, juveniles infectivos (JI's) de *Heterorhabditis bacteriophora* se obtuvieron de la producción *in vivo* del laboratorio de control biológico.

Las formulaciones utilizadas con los ingredientes usados para su elaboración lo cual fueron obtenidas de investigaciones previas y patentes (cuadro 1).

Cuadro 1. Formulaciones utilizadas para el almacenamiento de nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis bacteriophora*.

Formulaciones	Ingredientes	Cantidad (g)	Agua estéril (mL)	Autor
VERPH	Vermiculita	50	10	CN 101978824 A (2011)
	Hidróxido de Calcio	0.27		
	Peróxido de Hidrógeno	0.50		
VER	Vermiculita	50	11	CN 1335061 A (2002)
ARENA	Arena de río	25	3	Garcia G. (2006)
	Bentonita	18		
	Vermiculita	7		
ESPONJA	Esponja	1	0	Gaugler (2002)

## Fase 1

**Producción de nematodos entomopatógenos.** Se utilizaron nematodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora* del laboratorio de control biológico para infestar larvas de *Galleria mellonella* a una relación de 100 nematodos entomopatógenos JI's/ larva. En un bote de un galón de volumen (14 cm de diámetro) se colocaron dos tiras de papel manila (15 × 30 cm). Se humedeció con 20 mL de solución de nematodos entomopatógenos a una concentración de 1000 nematodos entomopatógenos JI's/mL. Después se introdujeron 200 larvas de *Galleria mellonella* por bote y se colocó una tela de algodón de 25 × 25 cm para cubrir la abertura del bote para evitar la salida de las larvas y mantener una buena aireación. Los botes con larvas infestadas fueron almacenados en la incubadora a 25°C. Al día cinco posinfestación las larvas fueron seleccionadas para ser incubadas en platos Petri (10 cm de diámetro × 1.5 cm). En la base de cada plato se colocó papel toalla de 9 cm de diámetro y sobre el papel se colocaron 30 a 40 larvas de *Galleria mellonella* que presentaban sintomatología de infección (color rojo), con texturas firmes y larvas completas. En una bolsa plástica se colocaron 10 platos Petri y se incubaron por 10 días en una caja de cartón (32 × 42 × 42 cm) a 25°C. Al día 15 después de la infección se revisaron los platos Petri y se colocaron en trampas White para la extracción de los nematodos entomopatógenos. Seis trampas White se colocaron en una bandeja (23 × 33 × 8 cm), se le agregaron 100 mL de agua y se tapó por 2 días, posteriormente se colectó el agua que contenía nematodo entomopatógenos que habían migrado hacia el agua. Los nematodos que salen del cuerpo de la larva son atraídos por la humedad del agua y forman puentes vivos para moverse. El agua colectada fue colocada en tubos de centrifugación de 45 mL y centrifugada a 250 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y los nematodos concentrados fueron almacenados en esponjas a 7°C en el refrigerador.

## Fase 2

### Elaboración de formulaciones en estado activo a 20°C

**Formulación Arena.** Se pesaron 26 g de arena de río, 18 g de bentonita y 6 g de vermiculita utilizando una balanza analítica. Los ingredientes fueron colocados en un recipiente de plástico y mezclados homogéneamente con la mano. Utilizando una probeta de vidrio se agregaron 3 mL de agua estéril a la mezcla asegurando que no tenga grumos. La mezcla fue esparcida en el recipiente y utilizando una micropipeta de 1000 µl se agregaron 7 mL de solución de nematodos entomopatógenos a una concentración de 166,000 nematodos JI's/mL y mezclada homogéneamente. La formulación fue colocada en bolsas Ziploc®, rotulado como ARENA y almacenado a 20°C. Se pesaron 5 g de la formulación y se calculó el porcentaje de humedad utilizando el equipo AeAdam® medidor de humedad (Garcia G. 2006).

**Formulación Vermiculita.** Se pesaron 50 g de vermiculita y se agregaron 18 mL de agua, se mezcló a mano utilizando guantes de nitrilo rompiendo los grumos hasta verse

homogénea. Después se agregaron 7 mL de solución de nematodos entomopatógenos utilizando una micropipeta de 1000  $\mu$ l a una concentración de 166,000 JI's/mL y mezclada homogéneamente. La formulación fue colocada en una bolsa (Ziploc<sup>®</sup>), rotulado como VER y almacenado a 20°C. Se pesaron 5 g de la formulación y se calculó el porcentaje de humedad utilizando el equipo AeAdam<sup>®</sup> medidor de humedad (Gui-tao et al. 2011).

**Formulación Vermiculita ph.** Se pesaron 50 g de vermiculita y se agregó una solución de peróxido de hidrógeno a 0.1% (9.5 mL de agua estéril en un tubo de ensayo con 0.27 mL de agua oxigenada y 0.5 g de hidróxido de calcio). Se agregó la solución a la vermiculita y se mezcló a mano utilizando guantes de nitrilo rompiendo los grumos hasta homogenizar. Se agregaron 7 mL de solución de nematodos entomopatógenos utilizando una micropipeta de 1000  $\mu$ l a una concentración de 166,000 JI's/mL y fue mezclando homogéneamente. La formulación fue colocada en una bolsa (Ziploc<sup>®</sup>), rotulado como VERPH, y almacenado a 20°C. Se pesaron 5 g de la formulación y se calculó el porcentaje de humedad utilizando el equipo AeAdam<sup>®</sup> medidor de humedad (Li et al. 2002).

**Formulación Esponja.** Se cortó una esponja de poliéter poliuretano de 5  $\times$  5 cm utilizando una tijera y se le agregó la solución de nemátodos entomopatógenos a una concentración de 166,000 nematodos JI's/mL. Utilizando una micropipeta de 1000  $\mu$ l se agregó la solución de nematodos entomopatógenos, agregando 1 mL a la vez hasta que sea absorbida por completo. La esponja fue almacenada en una bolsa (Ziploc<sup>®</sup>), rotulado como ESPONJA y almacenado a 20°C.

**Formulaciones con nematodos en estado latente a 20°C.** Para la elaboración de las formulaciones en estado latente se realizó el mismo proceso que con las formulaciones para el almacenamiento a 20°C descritos anteriormente. Antes de colocar las formulaciones en bolsas (Ziploc<sup>®</sup>), se pasó por un proceso de secado, el cual indujo a los nematodos entomopatógenos en un estado parcial de anhidrobiosis, reduciendo la actividad en agua de los nematodos entomopatógenos gradualmente, (van Zyl et al. 2013). Para esto se procedió al secado de las muestras. Las formulaciones se pusieron en recipientes de plástico y se colocaron en la cámara de flujo laminar (Labconco<sup>®</sup>) y se encendió en flujo de aire a 1.5 atmósferas con una temperatura interna de 22.2 $\pm$ 1°C. Cada 15 minutos se estuvo sacando una pequeña muestra de aproximadamente 0.5 g de cada formulación para monitorear el movimiento de los nematodos entomopatógenos en el estereoscopio. Cuando los nematodos entomopatógenos presentaron poco movimiento por la deshidratación parcial, fue el momento indicado para remover la formulación de la cámara de flujo laminar. En cuadro 2 se puede observar las horas requeridas para cada formulación necesarias para inducir al nematodo entomopatógeno a un estado parcial de anhidrobiosis. Las formulación se colocaron en una bolsa (Ziploc<sup>®</sup>), rotulada con nombre de cada formulación. Se almacenaron cuatro formulaciones en estado latente a 20°C.

Cuadro 2. Cuatro formulaciones utilizadas con porcentajes de humedad inicial, final y tiempo para inducir a un estado de latencia al nematodo entomopat6geno.

Formulaciones	Humedad Inicial (%)	Humedad Final (%)	Hora Secado
ARENA	20.44	10.63	2.66
VER	45.67	8.59	6.50
VERPH	45.67	8.18	6.83

### Fase 3

**Evaluaci3n de la mortalidad.** A los 7, 14, y 21 d1as despu3s de almacenados se extrajo 1 g de la formulaci3n y se le agregaron 10 mL de agua y se mezcl3. En la formulaci3n en esponja se agreg3 1 mL de agua con una micropipeta y se exprimio en el plato de pl3stico y se agregaron 10 mL de agua. En un tubo de vidrio con 9 mL se le agreg3 1 mL de la mezcla. Para todas las formulaciones en los dos estados de actividad se hizo lo mismo. Se usaron cinco repeticiones para todas las formulaciones en estado activo y latente. Se tom3 una muestra de 1 mL utilizando una micropipeta de 1000  $\mu$ L del tubo de vidrio. La muestra se dividi3 en cuatro gotas y se coloc3 en un plato Petri de vidrio y se hizo el conteo de vivos y muertos en microscopio. Al final se calcul3 el total de vivos y muertos de cada muestra y se calcul3 el porcentaje de mortalidad.

### Fase 4

**Prueba de infectividad.** A los 7, 14 y 21 d1as despu3s de almacenadas las formulaciones se procedio a evaluar la infectividad de cada una, para ello se utiliz3 un plato Petri con papel toalla en la base y se agreg3 0.5 g de cada formulaci3n la cual se humedeci3 con 1 mL de agua. A cada plato Petri se le colocaron 10 larvas de *Galleria mellonella*. Se usaron tres repeticiones para cada formulaci3n. Para la esponja se le agreg3 1 mL de agua, se exprimio en un plato de pl3stico y se le agreg3 2 mL de agua. Los platos Petri se almacenaron en una caja de cart3n por 5 d1as a 25°C. Despu3s de 5 d1as de la infecci3n se revis3 cada plato Petri y se contaron las larvas infectadas. Las larvas de color rojo, enteras y de textura firme fueron los par3metros que determinaron la infectividad de los nematodos entomopat6genos. Todas las larvas que no cumpl1an en estos par3metros fueron categorizadas como no infectadas. Para cada formulaci3n se realiz3 la identificaci3n de infectividad y se calcul3 el porcentaje de infectividad.

**Tratamientos.** Se elaboraron cuatro formulaciones para el almacenamiento de nematodos. Se almacenaron cuatro formulaciones a 20°C en estado activo y latente.

**Dise1o experimental.** Se utiliz3 un dise1o completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de tratamientos 4  $\times$  2. Se evaluaron cuatro tratamientos y dos estados de actividad. Para las cuatro formulaciones se evalu3 el porcentaje de mortalidad e

infectividad en los dos estados de actividad (activo y latente) a 20°C a los 7, 14 y 21 días después de la elaboración.

**Análisis estadístico.** Para los datos de mortalidad e infectividad se usó el análisis de varianza ANDEVA, utilizando una separación de medias con la prueba Duncan con un nivel de significancia de  $P \leq 0.05$  con el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® 9.3)

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Mortalidad a los 7 días después del almacenaje.** La formulación en esponja tuvo los porcentajes de mortalidad más bajo que el resto de las formulaciones en el estado latente. No se observó diferencia en el porcentaje de mortalidad entre las formulaciones de arena, vermiculita ni vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente. Las formulaciones con nematodos en estado activo presentaron mayor mortalidad especialmente los formulados en arena que presentaron mayor mortalidad significativamente que las formulaciones en esponja, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno. La mortalidad de los nematodos en la formulación en esponja en estado activo no fue diferente significativamente que las formulaciones en arena, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente (Figura 1). Al adicionar peróxido de hidrógeno en la vermiculita no tuvo un beneficio significativo con la vermiculita que no se le agregó y solo incrementa los costos de la formulación.

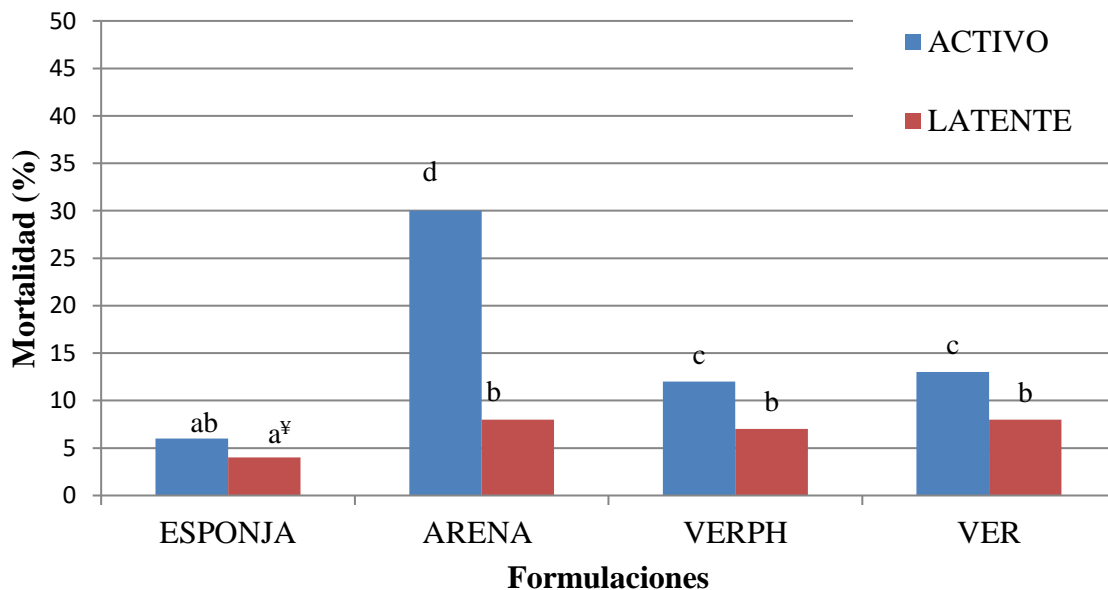


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados de actividad medida a los 7 días después de almacenados a 20°C. ¥ Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P \leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

(Li et al. 2002) menciono que al agregar peróxido de hidrógeno le provee mayor oxígeno a los nematodos en estado activo lo cual incrementa su viabilidad pero los resultados en esta investigación fueron diferentes.

**Mortalidad a los 14 días después del almacenaje.** La formulación en esponja tuvo los porcentajes de mortalidad más bajo que el resto de las formulaciones en el estado latente y activo. No se observó diferencia significativa en el porcentaje de mortalidad entre las formulaciones de arena, vermiculita ni vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente. Las formulaciones con nematodos en estado activo presentaron mayor mortalidad, especialmente la formulación en arena, que presentó mayor mortalidad significativamente que las formulaciones en esponja, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno. La mortalidad en los nematodos en la formulación en esponja en estado activo no fue diferente significativamente con las formulaciones en arena, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente (Figura 2). Al adicionar peróxido de hidrógeno en la vermiculita no tuvo un beneficio significativo con la vermiculita que no se le agrego.

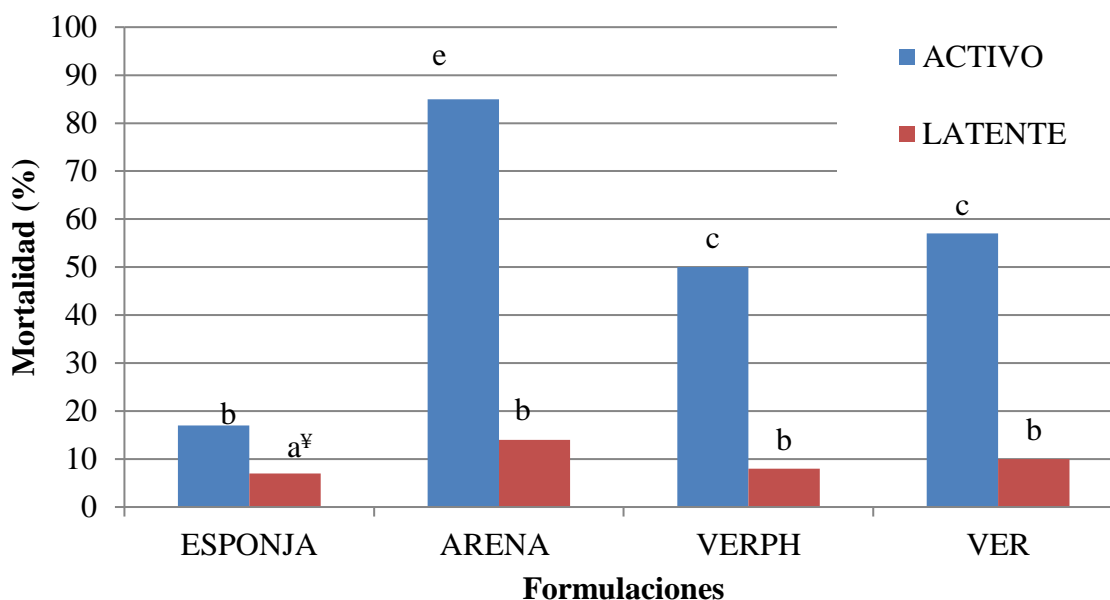


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad medida a los 14 días después de almacenados a 20°C. ¥ Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P \leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

La esponja puede mantener una alta viabilidad hasta por tres meses en refrigeración de 2-10°C y por 3 días de 22-25°C, (Gaugler 2002), en esta investigación se obtuvo menor mortalidad hasta los 14 días a 20°C.

**Mortalidad a los 21 días después del almacenaje.** La formulación en esponja con nematodos en estado latente tuvo la mortalidad más baja significativamente que el resto de las formulaciones. No se observó diferencia significativa en la de mortalidad entre las formulaciones de arena, vermiculita ni vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente. Las formulaciones con nematodos en estado activo presentaron mayor mortalidad, especialmente los formulados en arena, que tuvo mayor mortalidad (88%) significativamente que las formulaciones en esponja, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno, 18, 60 y 55%, respectivamente. La mortalidad de los nematodos en la formulación en esponja en estado activo no fue diferente significativamente que en las formulaciones en arena, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente (Figura. 3).

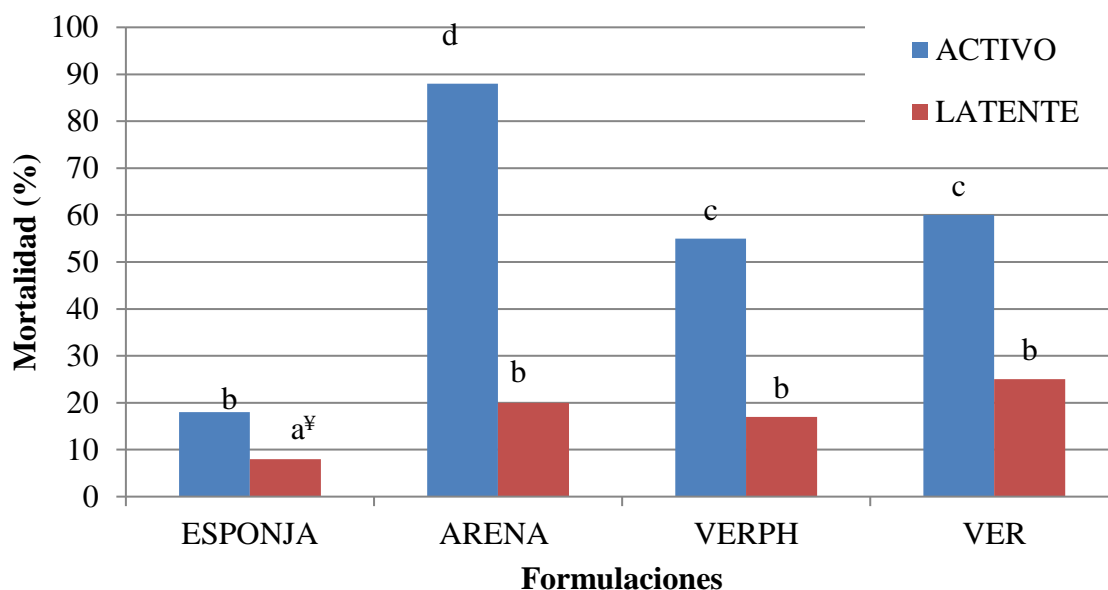


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de cuatro formulaciones en dos estados de actividad medida a los 21 días después de almacenados a 20°C. ¥ Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P \leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

En el estudio se observó mortalidades menores a las reportadas por (Garcia G. 2006) el cual indica que el proceso de secado para inducir a un estado parcial de latencia pudo haber sido causa de altas mortalidad en su investigación. Garcia indica que para inducir a latencia el utilizó una secadora de pelo modificado a 23°C lo cual pudo afectar a los

nematodos. En nuestro estudio la inducción a la latencia se realizó el secado lentamente utilizando el aire de una cámara de flujo laminar a  $22.2\pm 1^\circ\text{C}$ .

**Infectividad a los siete días después del almacenaje.** Las cuatro formulaciones evaluadas a los 7 días después de almacenadas no se observaron diferencia significativa en el porcentaje de infectividad (Figura 4). Los porcentajes de infectividad tuvieron un rango desde los 88 hasta 98%. No se observó diferencia significativa para el porcentaje de infectividad de los nematodos al comparar los dos estados de actividad de los nematodos activos y los latentes presentaron porcentajes de infectividad arriba del 85%. Lo que indica que independientemente del estado de actividad del nemátodo tiene la misma capacidad de infectar al huésped.

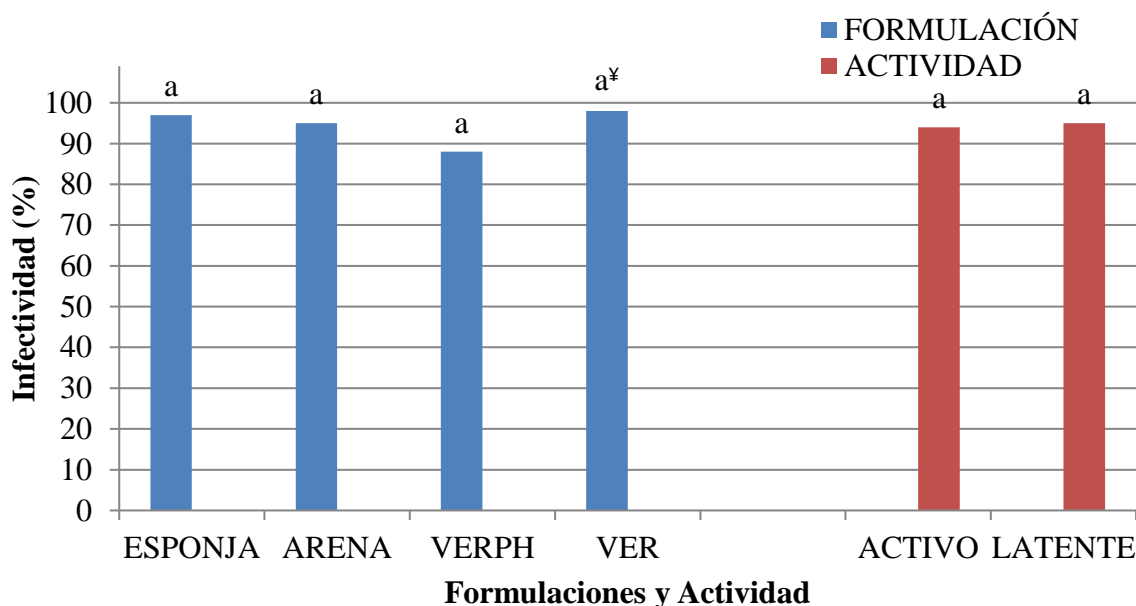


Figura 4. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones y dos estados de actividad a los siete días después de la elaboración a  $20^\circ\text{C}$ . % Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P\leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

**Infectividad a los 14 días después de almacenaje.** Las cuatro formulaciones evaluadas a los 14 días después del almacenaje no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de infectividad de los nematodos a las larvas de *Galleria Mellonella* (Figura 5). Los porcentajes de infectividad estuvieron arriba de 87% y que la infectividad en la formulación de vermiculita, vermiculita con peróxido de hidrógeno, esponja y arena estuvieron arriba del 86%. Indicando que independientemente del estado de actividad del nematodo tiene la misma capacidad de infectar al huésped y ser eficientes en el control de la plaga. A los 14 días la alta actividad o movimiento del nematodo,

estado activo no tuvo efecto en la infectividad ya que la infectividad fue igual que si el nematodo se encontraba en estado latente.

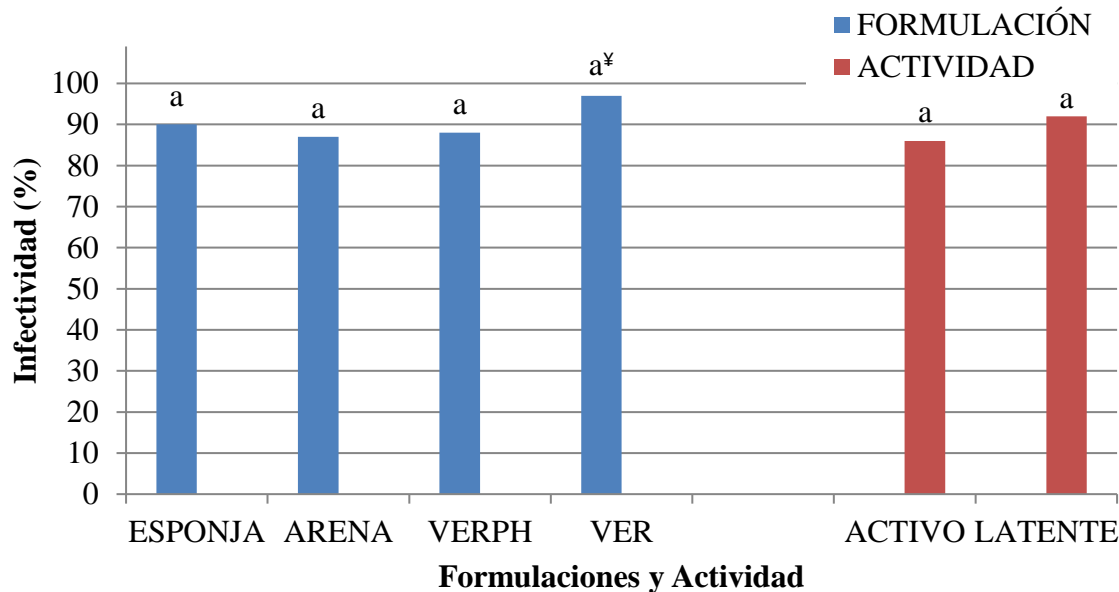


Figura 5. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones y dos estados de actividad a los 14 días después de la elaboración a 20°C. ¥ Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P \leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

**Infectividad a los 21 días después del almacenaje.** La formulación en esponja tuvo los porcentajes de infectividad más alto arriba del 80% que el resto de las formulaciones en el estado latente. No se observó diferencia en el porcentaje de mortalidad entre las formulaciones de arena, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno las cuales presentaron porcentajes de infección de 67, 70 y 70%, respectivamente. Al comparar la infectividad de los nematodos en estado activo se observó que los nematodos obtenidos de la formulación en esponja tuvo los porcentajes de infectividad más altos que los que se formularon en vermiculita, vermiculita con peróxido de hidrógeno y arena. Los nematodos formulados en arena presentaron porcentajes de infectividad más bajos (37%) los cuales fueron menores que la infectividad ocasionada por los formulados en vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno. La infectividad de los nematodos en la formulación en esponja en estado activo no fue diferente significativamente que las formulaciones en arena, vermiculita y vermiculita con peróxido de hidrógeno en estado latente. La formulación en esponja en estado latente presento los porcentajes de infectividad más altos que todas las formulaciones y estados de actividad (Figura 6).

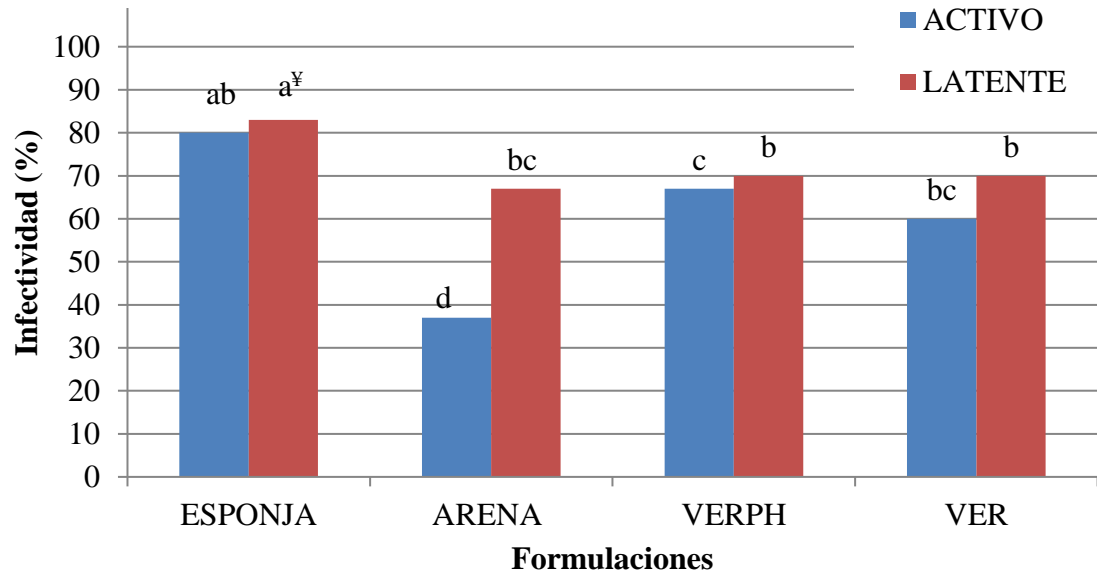


Figura 6. Porcentaje de infectividad de cuatro formulaciones en dos estados a de actividad medida a los 21 días después de almacenados a 20°C. ¥ Valores en columnas con distintas letras son estadísticamente diferente entre sí según la prueba LSMEANS ( $P \leq 0.05$ ). VERPH = Vermiculita con peróxido de hidrógeno, VER = Vermiculita

#### **4. CONCLUSIONES**

- Las formulaciones en estado de latencia tuvieron menores porcentajes de mortalidad en comparación con las formulaciones en estado activo, excepto en esponja que no tuvo diferencia significativa en estado activo a 20°C.
- Las formulaciones en los dos estados de actividad no tuvieron diferencia significativa en el porcentaje de infectividad a los 7 y 14 días después de la elaboración. A los 21 días después de la elaboración las formulaciones en estado de latencia tuvieron mayores porcentajes de infectividad en comparación con las formulaciones en estado activo excepto la formulación en esponja que no tuvo diferencia.
- Independientemente el estado de actividad, la formulación en esponja no se observó diferencia significativa en el porcentaje de mortalidad e infectividad.

## 5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la mortalidad e infectividad de nematodos entomopatógenos por tiempos más largos de tiempo.
- Evaluar mayor tiempo de inducción a estado latente de los nematodos entomopatógenos.
- Evaluar diferentes concentraciones de nematodos entomopatógenos por tiempos más largo de almacenamiento en futuras investigaciones.
- Evaluar ensayos en campo para determinar la aplicabilidad de los nematodo entomopatógenos.
- Evaluar el almacenamiento a otras temperaturas y utilizar *Steinernema carpocapsae* para determinar si hay diferencia en la sensibilidad en cambios abióticos entre los dos géneros de nematodos entomopatógenos.
- Se recomienda utilizar la formulación en esponja para el almacenamiento de nematodos entomopatógenos.

## 6. LITERATURA CITADA

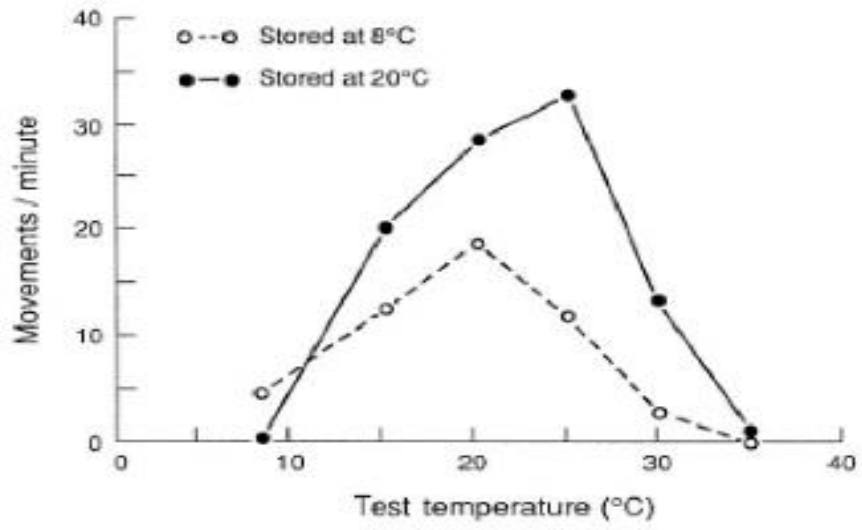
- Bedding R, Akhurst RJ, Kaya HK. 1993. Nematodes and the biological control of insects pests. : Csiro Publishing. ISBN: 0643105913, 9780643105911.
- Campos-Herrera R. 2015. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and applied technologies for sustainable plant and crop protection. Cham: Springer International Publishing; Springer. (Sustainability in plant and crop protection; vol. 1). ISBN: 9783319182667. p 532.
- Cano E, Carballo M, Guharay F, López JA. 2004. Control biológico de plagas agrícolas: Control biológico de insectos mediante nematodos entomopatógenos. Turrialba, (Costa Rica), Managua, (Nicaragua): Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. (Serie técnica Manual técnico; no. 53). ISBN: 9992403160, 9789992403167. p.224
- García G. A. 2006. Formulación de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos. Tulancingo de bravo, Hidalgo, (México): Instituto Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. p. 58.[internet]. [Consultado el 30 agosto de 2016].  
<http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/11149/Formulaci%C3%B3n%20de%20bioinsecticidas%20a%20base%20de%20nematodos%20entomopatogenos.pdf?sequence=1>
- Gaugler R. 2002. Entomopathogenic Nematology. Wallingford, Oxon, New York: CABI Pub. 1 (x, 388. ISBN: 0851997910, 9780851997919. [internet]. [Consultado el 25 mayo de 2016].  
[https://books.google.hn/books/about/Entomopathogenic\\_Nematology.html?id=h0F-h4vP9coC&redir\\_esc=y](https://books.google.hn/books/about/Entomopathogenic_Nematology.html?id=h0F-h4vP9coC&redir_esc=y)
- Grewal PS, Ehlers R-U, Shapiro-Ilan DI. 2005. Nematodes as biocontrol agents. Wallingford, UK, Cambridge, MA: CABI Pub. 1 online resource (xviii, 505 (CAB books). ISBN: 1845931424, 9781845931421. [internet]. [Consultado el 12 abril de 2016].  
[https://books.google.hn/books?hl=en&lr=&id=jfleY2lEb7MC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Nematodes+as+biocontrol+agents&ots=cjP0XPgcKr&sig=b73E3V3TsNnR0F\\_g5R1q8hWuAYg#v=onepage&q=Nematodes%20as%20biocontrol%20agents&f=false](https://books.google.hn/books?hl=en&lr=&id=jfleY2lEb7MC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Nematodes+as+biocontrol+agents&ots=cjP0XPgcKr&sig=b73E3V3TsNnR0F_g5R1q8hWuAYg#v=onepage&q=Nematodes%20as%20biocontrol%20agents&f=false)
- Grewal PS, Ramon G. 1999. Entomopathogenic Nematodes [Methods in Biotechnology]. 5.p.271-299

- Gui-tao D, Chao J, Hong-hao LI, Wei-bin R, Yu-bao GA, Chun-chun. 2011. Method for preserving entomopathogenic nematodes at normal temperature by using expanded vermiculite. CN 101978824 A.
- Hanson P. 1993. Control biológico de insectos. Turrialba, Costa Rica: CATIE, Programa de Agricultura Sostenible, Area de Fitoprotección. ii, 40 (Colec. Temas de fitoprotección para extensionista; no. 208). ISBN: 9977571449, 9789977571447.
- Li C, Xiuling L, Xiangyang H, Qiu Jian L, 2002. Storing method of entomopathogenic nematode. CN 1335061 A.
- Ralf-Udo E. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Springer International Publishing; Springer.
- Sáenz A. A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. 26(2).
- Van Zyl C, Malan AP, Addison M. 2013. Storing requirements of entomopathogenic nematodes. Stellenbosch University (South Africa). Department of Conservation Ecology and Entomology, Faculty of AgriScience. [internet]. [Consultado el 30 agosto de 2016] <http://www.hortgro-science.co.za/wp-content/uploads/2015/09/Van-Zyl-Malan-Addison-nematodes.pdf>.

## 7. ANEXOS

Anexos 1. Formulaciones para el almacenamiento de diferentes nematodos y la vida anaquel a diferentes temperaturas. Fuente: (Gaugler 2002)

Formulation	Nematode species	Strain	Shelf-life (months)	
			22–25°C	2–10°C
<b>Actively moving nematodes</b>				
Sponge <sup>a</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	All	0.03–0.1	2.0–3.0
	<i>H. bacteriophora</i>	HP88	0	1.0–2.0
Vermiculite <sup>a</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	All	0.1–0.2	5.0–6.0
	<i>S. feltiae</i>	UK	0.03–0.1	4.0–5.0
	<i>H. megidis</i>	UK	0	2.0–3.0
<b>Reduced mobility nematodes</b>				
Alginate gels	<i>S. carpocapsae</i>	All	3.0–4.0	6.0–9.0
	<i>S. feltiae</i>	SN	0.5–1.0	4.0–5.0
Flowable gels	<i>S. carpocapsae</i>	All	1.0–1.5	3.0–5.0
	<i>S. glaseri</i>	NJ43	0.03–0.06	1.0–1.5
	<i>S. scapterisci</i>	Colon	1.0–1.5	3.0–4.0
Liquid concentrate <sup>a</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	All	0.16–0.2	0.4–0.5
	<i>S. riobrave</i>	RGV	0.1–0.13	0.23–0.3
<b>Anhydrobiotic nematodes</b>				
Wettable powder	<i>S. carpocapsae</i>	All	2.0–3.5	6.0–8.0
	<i>S. feltiae</i>	UK	2.5–3.0	5.0–6.0
	<i>H. megidis</i>	UK	2.0–3.0	4.0–5.0
	<i>H. zealandica</i>	NZ	1.0–2.0	3.0–4.0
Water dispersible granules <sup>a</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	All	4.0–5.0	9.0–12.0
	<i>S. feltiae</i>	SN	1.5–2.0	5.0–7.0
	<i>S. riobrave</i>	RGV	2.0–3.0	4.0–5.0



Anexos 2. El movimiento de los nematodos a diferentes temperaturas. Fuente: (Bedding et al. 1993)