

**Evaluación de dos métodos de extracción de la
bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*
del nematodo entomopatógeno
*Heterorhabditis bacteriophora***

**Maximo Brajan Arias Yapias
Mirta Araceli Murillo Pineda**

**Escuela Agrícola Panamericana Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de dos métodos de extracción de la
bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*
del nematodo entomopatógeno
*Heterorhabditis bacteriophora***

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

Presentado por

**Máximo Brajan Arias Yapias
Mirta Araceli Murillo Pineda**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Evaluación de dos métodos de extracción de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*

**Maximo Brajan Arias Yapias
Mirta Araceli Murillo Pineda**

Resumen. El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* es un parásito natural de insectos del género Coleóptera, Díptera, Lepidóptera, Ortóptera y Sifonáptera, el cual al ingresar al cuerpo libera una bacteria que es la responsable de causar la muerte de estos insectos. El nematodo presenta una simbiosis muy especial con la bacteria *Photorhabdus luminescens*, que produce antibacterianos que preserva el insecto mientras el nematodo se desarrolla dentro del insecto. El objetivo de este estudio fue evaluar y definir parámetros para la extracción de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* a través de dos métodos, el primero la maceración de nematodos extraídos de larvas infestadas con el nematodo y el segundo por la extracción de la hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con la bacteria; también determinar la patogenicidad de la bacteria producida en medios de cultivo artificiales a partir de los métodos de macerado y hemolinfa. Para el método de aislamiento por macerado se maceraron 20,000, 40,000 y 80,000 nematodos. En el método de hemolinfa se evaluaron tres lugares de extracción 2°-3°, 6°-7°, 10°-11° inter segmento de larvas infectadas. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), se evaluaron tres tratamientos con tres repeticiones, las medias se separaron usando DUNCAN. Para el bioensayo de patogenicidad se infectaron diez larvas de *Galleria mellonella* con tres diferentes concentraciones de la bacteria aislada por los métodos anteriores. Las concentraciones usadas fueron la tercera, sexta y novena dilución de la bacteria, se evaluó el porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* a las 48 horas después de la exposición. En el bioensayo se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de dos métodos con tres concentraciones y se realizó una separación de medias usando LSMEANS. El tratamiento de macerado de 20,000 nematodos presentó el mayor número de colonias aisladas en comparación con los otros tratamientos y el tratamiento de extracción de la hemolinfa del 6° y 7° inter segmento presentó el mayor número de colonias aisladas. En el bioensayo se observó la eficiencia patogénica de la bacteria producida en medios artificiales, se determinó mayor porcentaje de mortalidad de *Galleria mellonella* por la bacteria aislada del método de macerado.

Palabras clave: Control biológico, *Galleria mellonella*, patogenicidad.

Abstract. The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* is a natural parasite insect of the genus Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Orthoptera and Siphonaptera which entering the body releases a bacteria that is responsible for causing the death of these insects. The nematode has a very special symbiosis with the bacterium *Photorhabdus luminescens* that produces antibacterial substances that preserves the insect while the nematode develops inside the insect. The objective of this study was to evaluate and define parameters for extraction of the symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens* using two methods. The first method, maceration extracted from nematode infested with the nematode larvae and the second, extraction larva hemolymph *Galleria mellonella* infected with the bacteria, but also to determine the pathogenicity of the bacteria produced in artificial media from macerated methods hemolymph. For the isolation-macerated method, we macerated 20,000, 40,000, and 80,000 nematodes. In the method of hemolymph, we evaluated three mining sites 2°-3°, 6°-7°, 10°-11° inter segment infected larvae. We used a completely randomized design (CRD) that was assessed three treatments with three replications. The means were separated by using DUNCAN. For the pathogenicity bioassay, ten *Galleria mellonella* larvae were infected with three different concentrations of the bacteria isolated by the above methods. The used concentrations were the third, sixth and ninth dilution of bacteria. Mortality percentage of *Galleria mellonella* larvae was evaluated 48 hours after the exposure. In the bioassay, it was used a completely randomized design with factorial arrangement of two methods with three concentrations and mean separation performed using LSMEANS. Macerate treatment of 20,000 nematodes had the highest number of isolated colonies compared to the other treatments and extraction treatment of hemolymph of the 6th and 7th segment showed the highest inter single colony number significantly. In the bioassay was observed the pathogenic bacteria efficiency in the artificial media produced, determined the highest mortality of *Galleria mellonella* by bacteria isolated from macerated method.

Keywords: Biological control, *Galleria mellonella*, pathogenicity.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros y figuras	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	12
5. RECOMENDACIONES	13
6. LITERATURA CITADA.....	14

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Comparación del número de colonias aisladas a partir de hemolinfa extraída de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas. Zamorano, 2013	10
2. Comparación de número colonias aisladas a partir de nematodos macerados extraídos de larvas <i>G. mellonella</i> infectada. Zamorano, 2013.	10
3. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de infectadas larvas de <i>G. mellonella</i> . Zamorano,2013 (M×C).....	11

Figuras	Página
1. Maceración de nematodos entomopatogenos, usando mortelo y pistilo.	4
2. Extracción de hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> . Con una aguja de 1 mL.	5
3. Dilución de la bacteria obtenida por el método de macerado.	7
4. Dilución de la bacteria obtenida por el método de hemolinfa.	7
5. Tercera, sexta y novena dilución para inyectar larvas de <i>Galleria mellonella</i>	8
6. Bioensayo evaluado a las 48 horas de infectadas.	9

1. INTRODUCCIÓN

Cada día las personas estamos expuestas con mayor frecuencia a productos químicos a través de los alimentos y el ambiente, y gran parte de ellos vienen de los residuos de plaguicidas. La preocupación de la sociedad por este hecho se debe a evidencias que relacionan el uso inadecuado de químicos para el control de plagas, con degradación de la calidad de aguas, contaminación de suelos, aparición de insecto resistencia y problemas de salud en el hombre.

En los últimos veinte años, los nematodos entomopatógenos han tomado mucho auge como una alternativa de control de insectos plaga. Son un grupo muy importante con el potencial de ser usados como bio insecticidas (Sotelo *et al.* 2013). Los principales géneros de nematodos entomopatógenos utilizados en este rubro son *Steirnernema* y *Heterorhabditis*. Los nematodos entomopatógenos son parásitos naturales de Coleóptera, Díptera, Lepidóptera, Ortóptera y Siphonatera.

La especie *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) es un excelente controlador biológico para insectos del suelo (Grewal *et al.* 2005). El nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* fue descrito por primera vez en 1975 como un nuevo género, la especie y la familia (Heterorhabditidae) de Rhabditida (Poinar 1975) este es un entomopatógeno obligado, considerado como agente potencial de control biológico. Las hembras jóvenes pueden ser hermafroditas o normales, los machos solo se producen en la generación de fertilización cruzada (Fernández *et al.* s.f). Este género presenta una relación simbiótica con la bacteria del genero *Photorhabdus*.

Heterorhabditis bacteriophora transporta la bacteria *Photorhabdus luminescens* en su tracto digestivo y una vez que este ingresa al insecto huésped por su aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) regurgita la bacteria en el hemocele del insecto quien muere por septicemia, en un intervalo de 24-48 horas, asimismo la bacteria producen antibióticos que evitan el crecimiento de otro tipo de bacterias dentro del insecto y preserva los tejidos semi descompuestos (Carballo *et al.* 2004) que son aprovechados por el nematodo para su alimentación.

Photorhabdus luminescens es una entero bacteria de forma bacilar y Gram negativa con anaerobiosis facultativas, que no tienen estadios resistentes ni se encuentran en la naturaleza de forma libre, sino solamente en los nematodos o insectos hospedantes. Presenta características tales como bioluminiscencia y dos formas de la bacteria primaria y secundaria, la primaria forma colonias rojas en Agar MacConkey, produce antibióticos y es la fase infectiva. La forma secundaria no absorbe colorantes, puede o no producir

antibióticos y la importancia de la forma primaria de la bacteria es su capacidad de ser propagada por nematodos *in vitro* (Sáenz A. 2005).

En Zamorano se produce de manera artesanal los nematodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora*. El método de producción *in vivo* consiste en usar como hospedero larvas de *Galleria mellonella*, lepidóptera que se alimenta de la cera en las colmenas de la abejas. La fase larval de este insecto se infecta con nematodos entomopatógenos, la bacteria simbiote es transportada y liberada por el nematodo y posteriormente provoca la muerte de las larvas por septicemia, descomponen los tejidos, liberan antibióticos que preservan las larvas (Eleftherianos *et al.* 2006) los nematodos entomopatógenos se reproducen en el interior del cadáver alimentándose de la bacteria simbiote producida en su interior. Los nematodos posteriormente emergen de la larva muerta y son cosechados para ser utilizados en los cultivos para el control de plagas (Rosales *et al.* 2009). El método *in vivo* es costoso por el alto requerimiento de mano de obra (Nicholls Estrada 2008).

El objetivo de este estudio fue comparar y definir parámetros de los métodos de maceración y hemolinfa para la extracción de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* y determinar la patogenicidad de la bacteria simbiote *P. luminescens* producida en medios de cultivo artificiales a partir de los métodos de macerado y hemolinfa. La importancia de este estudio radica en el establecimiento y reproducción de la bacteria en medios de cultivo para iniciar una reproducción *in vitro* de los nematodos entomopatógenos con el fin de optimizar el protocolo apropiado para el aislamiento de la bacteria simbiote en el laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras ubicado en el valle del Yeguaré a 32 km de Tegucigalpa, D.C. en las coordenadas geográficas latitud norte de 14° 00' 46.97" longitud Oeste de 87° 00' 13.54" a una altura de 787 msnm, con una precipitación media anual de 1,100 mm y una temperatura promedio de 25°C.

La investigación se dividió en dos fases: En la primera se evaluaron dos métodos de extracción de la bacteria *Photorhabdus luminescens*; mediante maceración de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* extraídos de larvas infestadas con el nematodo y extracción de la hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con la bacteria *P. luminescens*. En la segunda fase se hizo un bioensayo de patogenicidad de la bacteria *P. luminescens* aislada y producida en medios artificiales infectando larvas de *G. mellonella*.

Material biológico. Los nematodos entomopatógenos que se utilizaron en el estudio se obtuvieron de la producción *in vivo* del laboratorio de enemigos naturales, pertenecientes a la familia Heterorhabditidae, producidas en las larvas de *G. mellonella* como hospedero. Cada larva de *G. mellonella* fue infectada con 1000 nematodos juveniles infectivos de *H. bacteriophora* los cuales se reprodujeron dentro de las larvas en 15 días, se recuperaron entre 80,000 hasta 200,000 infectivos juveniles por larva. Para la recuperación de los nematodos en el laboratorio fue necesario usar trampas White modificadas que consiste en colocar dentro de una bandeja plástica (22 cm de ancho × 28 cm de largo × 10 cm de altura) 100 ml de agua esterilizada, y placas Petri de vidrio de 80 mm × 15 mm con un disco de papel filtro de laboratorio humedecido. Sobre el papel filtro se colocaron las larvas de *G. mellonella* que presentaron sintomatología de infección y permanecieron 15 días en incubación a una temperatura de 25 °C. Los nematodos infectivos juveniles tienden a orientarse hacia los lugares con mayor humedad por tanto los que emergen de la trampa White modificada fueron recuperados a las 48 horas de instaladas las bandejas. Fueron colocados en tubos de centrifugación de 40 mL y centrifugados a 1200 rpm durante dos minutos, como resultado se obtuvo una solución más concentrada con miles de nematodos. Previo a ser utilizados los nematodos infectivos juveniles fueron sanitizados con Hipoclorito de sodio al 0.1% para su posterior siembra y extracción de bacteria con el fin de aislar la bacteria *P. luminescens* presente en su tracto digestivo.

Extracción de la bacteria *Photorhabdus luminescens*. La extracción de la bacteria se hizo mediante dos métodos de los cuales las variables a medir fueron el número de colonias aisladas presentes en cada placa Petri.

Método de maceración. En este ensayo se evaluaron tres cantidades de nematodos para optimizar el protocolo de extracción y aislamiento de la bacteria *P. luminescens* macerando nematodos entomopatógenos juveniles infectivos recuperados en las trampas White modificadas, que contienen en su tracto digestivo la bacteria. Los tratamientos evaluados fueron la maceración de 20,000, 40,000, y 80,000 nematodos con tres repeticiones cada una. Se maceraron independientemente cada repetición por un periodo de 30 minutos en un mortero con un pistilo (figura 1). Se tomó una alícuota de la solución de nematodos macerados y se sembró en placas Petri con MacConkey agar y se incubaron por 48 horas a 28°C.



Figura 1. Maceración de nematodos entomopatógenos, usando mortero y pistilo.

Método de hemolinfa. Se evaluaron tres puntos de extracción de hemolinfa de larvas *Galleria mellonella* con el fin de optimizar el protocolo de asilamiento de la bacteria *P. luminescens* se extrajo hemolinfa de larvas muertas por septicemia, luego de 48 horas de infectadas con la bacteria *P. luminescens* que fue introducida por los nematodos entomopatógenos infectivos *Heterorhabditis bacteriophora*. Esta bacteria al ser introducida se mueve en todo el hemocele que descompone tejidos y órganos internos de la larva. Para esto se expuso 12 larvas de *Galleria mellonella* del sexto estadio con un peso de 200 mg a una solución de 10,000 nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora*. Los tratamientos fueron la extracción de la hemolinfa en el 2°-3°, 6°-7° y 10° - 11° inter segmento de la larva de *G. mellonella* con tres repeticiones en cada tratamiento, realizado con una larva independiente (Vázquez Valdés 2002). Previo a la extracción se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.1%. La extracción se llevó a cabo con una aguja de insulina de 1 mL (figura 2), se tomó una gota de hemolinfa que fue sembrada en placas Petri con MacConkey agar y se llevaron a incubar por 48 horas a 28°C.



Figura 2. Extracción de hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. Con una aguja de 1 mL.

Conteo de colonias aisladas. Se contaron las colonias aisladas usando el programa “ImageJ 1.44”. Este programa efectuó un conteo automático de imágenes de alta resolución, ayudado de un degrade y un cambio de colores en la foto. Posterior a eso se ejecutó un filtro de colores y figuras utilizando como factor de selección objetos circulares con más de 55% de circularidad. Debido a que las colonias formadas de *P. luminescens* presentan esta característica de ser de ligeramente circulares. De esta manera se obtuvo el conteo de colonias aisladas de cada uno de los tratamientos y de las repeticiones ya mencionados en el ensayo de extracción y aislamiento de la bacteria *P. luminescens*.

Bioensayo de patogenicidad de la bacteria. Proceso utilizado para la determinación del potencial de los agentes controladores de insectos (Henríquez 2002). El bioensayo de patogenicidad se ejecutó para los dos métodos, macerado de nematodos y la extracción de hemolinfa, utilizando diluciones a baja, media y alta concentración de bacterias que se inyectaron a las larvas de *Galleria mellonella* y así evaluar el porcentaje mortalidad a las 48 horas.

Se desinfectaron 180 larvas de *Galleria mellonella* con hipoclorito de sodio al 0.1% durante cinco minutos, luego se enjuagaron tres veces y se dejaron airear bajo la cámara de flujo laminar. Se tomó la placa que contenía 2629 colonias aisladas por el método macerado y 1307 colonias formadas por el método de extracción de hemolinfa, se agregaron 10 mL de agua esterilizada a cada placa para la extracción de la bacteria. En el caso de los 10 mL extraídos de la placa de macerado se utilizó 0.5 mL de la dilución cero que fueron colocados a la dilución uno (figura 3), y los 10 ml obtenidos de la placa de extracción por hemolinfa se colocó 1 mL de la dilución cero a la dilución uno, esto para equilibrar las concentraciones de bacteria (figura 4).

A partir de esta dilución cero se obtuvo nueve diluciones de las cuales se seleccionaron tres, la tercera, sexta y novena dilución que fueron establecidas como alta, media y baja concentración (figura 5). Se infectaron de diez larvas por tratamiento con tres repeticiones cada una con 100 µL de cada concentración de la bacteria *Photobacterium luminescens*, la infección se efectuó entre el 11° y 12° inter segmento con una jeringa de 1mL. Cada unidad experimental fue representada por un plato Petri con 10 larvas infectadas (figura 6). La mortalidad se evaluó luego de 48 horas.

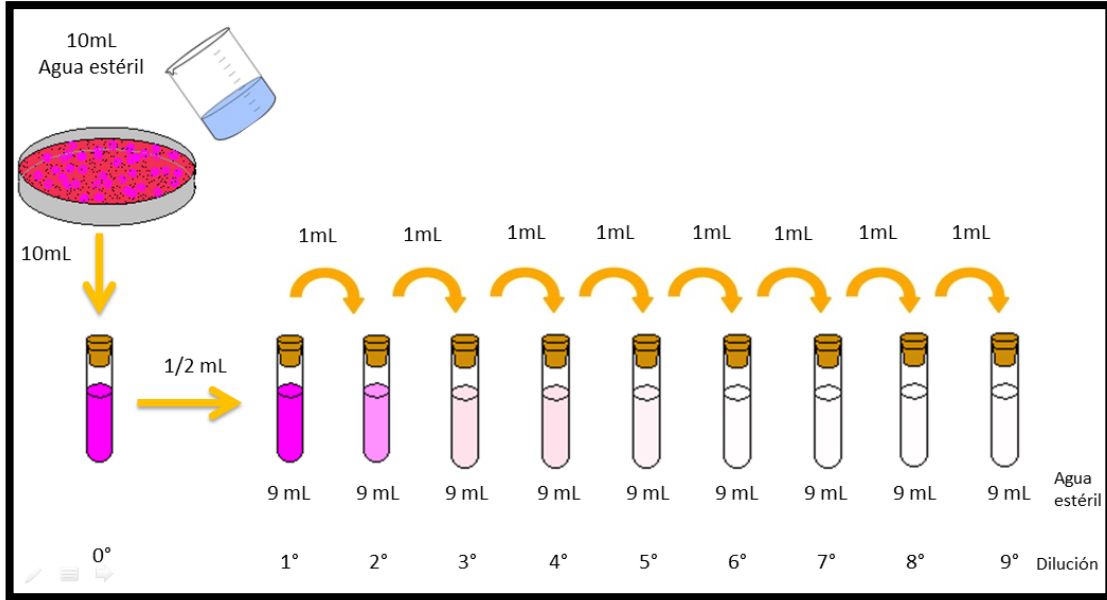


Figura 3. Dilución de la bacteria obtenida por el método de macerado.

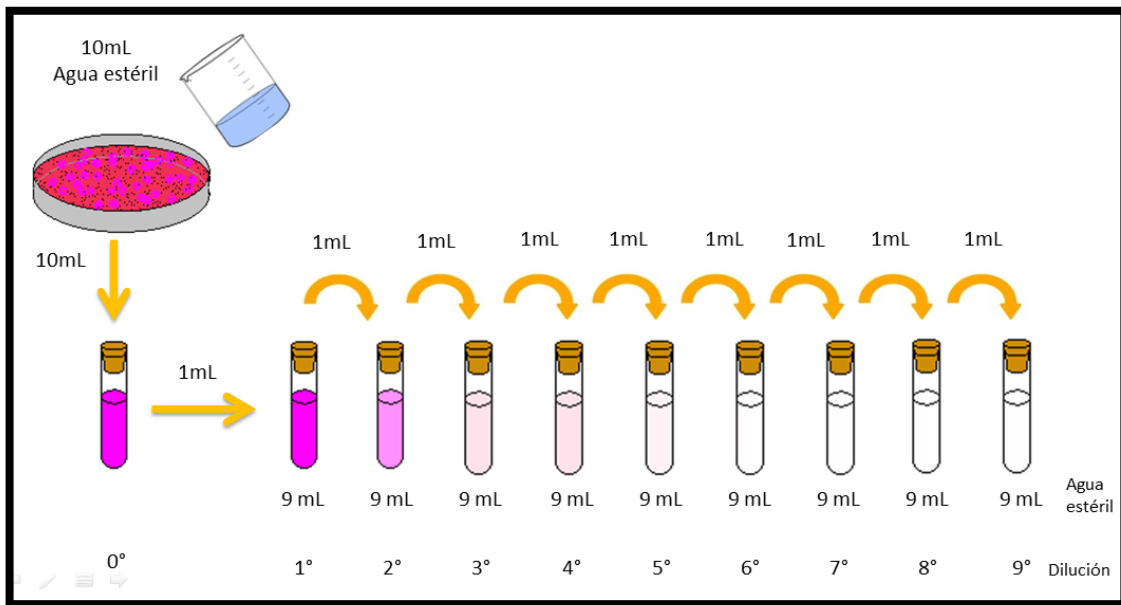


Figura 4. Dilución de la bacteria obtenida por el método de hemolinfa.

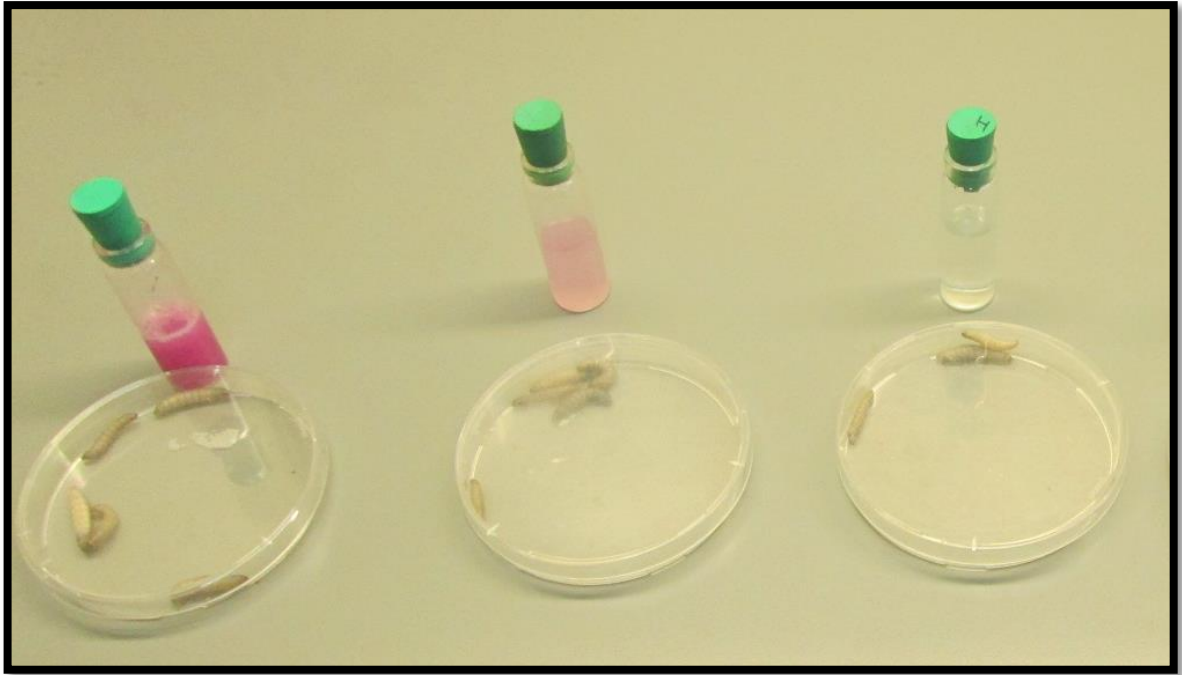


Figura 5. Tercera, sexta y novena dilución para inyectar larvas de *Galleria mellonella*.

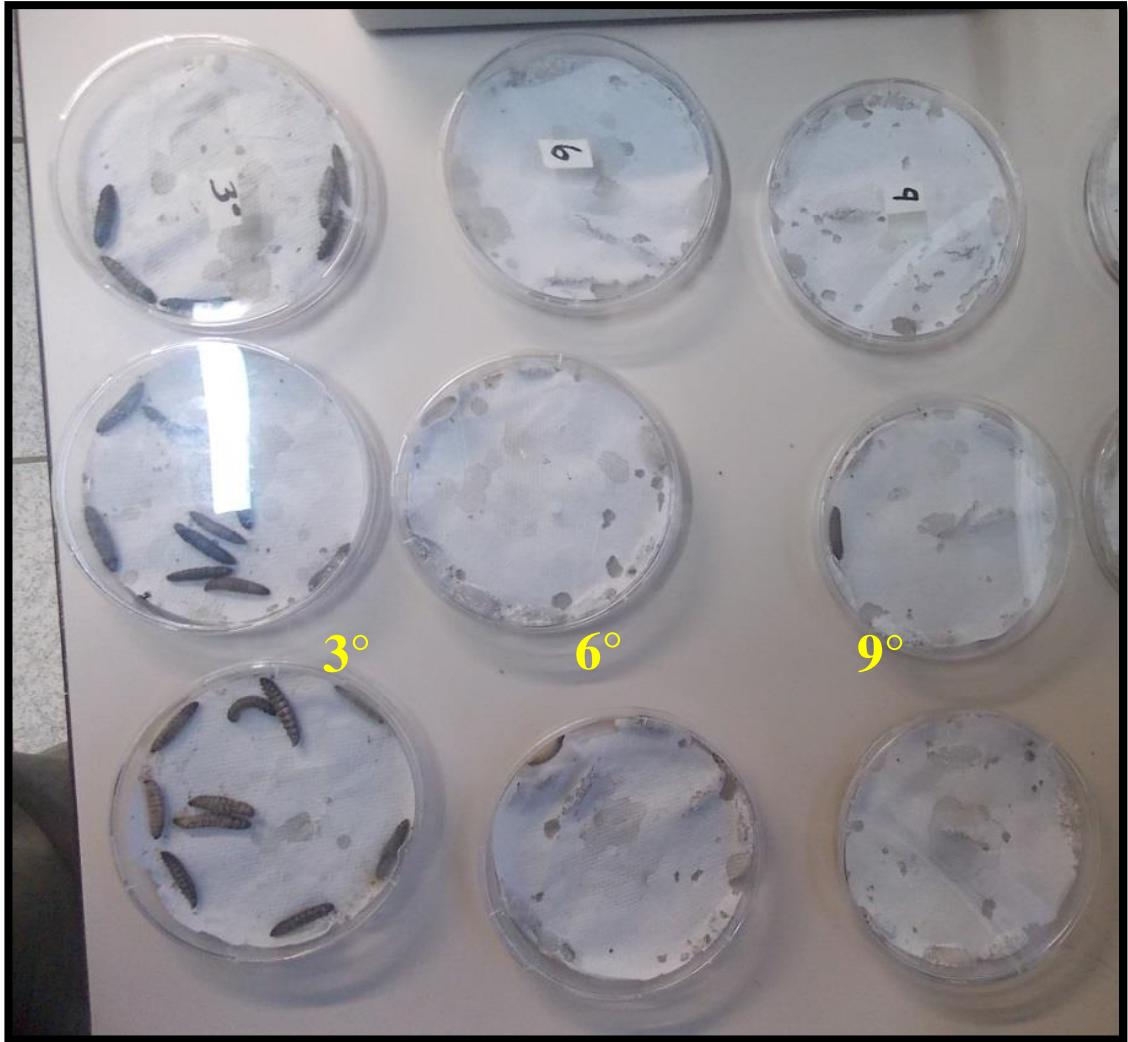


Figura 6. Bioensayo evaluado a las 48 horas de infectadas.

Diseño experimental. Para el método de aislamiento de macerado y hemolinfa se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos por método y tres repeticiones que hizo un total de 18 unidades experimentales. A través del programa de análisis estadístico SAS (statistical analysis system), y se hizo una separación de medias por el método DUNCAN y un análisis de varianza GLM. En el bioensayo de patogenicidad se utilizó un arreglo factorial de dos métodos por tres concentraciones que hizo un total de seis observaciones. Se usó el programa de análisis estadístico SAS (statistical analysis system), se hizo una separación de medias LSMEANS y un análisis de varianza GLM.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de la bacteria. En la evaluación del método de hemolinfa, el tratamiento de la obtención del sexto y séptimo inter segmento presentó un mayor número de colonias aisladas a comparación de los demás tratamientos. También se observó que el número de colonias aisladas en el tratamiento décimo y onceavo fue significativamente mayor que el número de colonias que se obtuvo de la extracción del intersegmento segundo y tercero (Cuadro1).

Cuadro 1. Comparación del número de colonias aisladas a partir de hemolinfa extraída de larvas de *G. mellonella* infectadas. Zamorano, 2013.

Inter segmentos	Número de colonias aisladas
Segundo y tercero	192.5 c ¥
Sexto y séptimo	1731.5 a
Decimo y onceavo	627.0 b

¥ Valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí según la prueba Lsmeans (P<0.05).

En el método de macerado, el tratamiento de 20,000 nematodos presentó mayor número de colonias aisladas a comparación del tratamiento de 40,000 nematodos, este es significativamente diferente. No se encontró diferencia significativa entre macerar 40,000 y 80,000 nematodos para la producción de número de colonias. (Cuadro2).

Cuadro 2. Comparación de numero colonias aisladas a partir de nematodos macerados extraídos de larvas *G. mellonella* infectada. Zamorano, 2013.

Número de nematodos	Número de colonias aisladas
20,000	3637.2 a ¥
40,000	1858.7 b
80,000	1435.8 b

¥ Valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí según la prueba Lsmeans (P<0.05).

A partir de este resultado se seleccionaron cada uno de los tratamientos con mayor cantidad de colonias de cada método para su evaluación con respecto al nivel de patogenicidad en el bioensayo realizado.

Bioensayo de patogenicidad. En el bioensayo de patogenicidad se evaluó el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* a las 48 horas posterior a la inyección de la bacteria *P. luminescens* a tres concentraciones baja, media y alta.

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de infectadas larvas de *G. mellonella*. Zamorano, 2013 (M×C).

Método	Concentración			Valor P		
	Baja	Media	Alta	Método	Concentración	M × C
Hemolinfa	13.3 b [¥]	26.7 b	90.0 n.s.	<.0001	<.0001	0.007
Macerado	56.7 a	93.3 a	100.0			

[¥] Valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí según la prueba Lsmeans (P<0.05).

n.s. Valores en columnas sin letra, no difieren estadísticamente entre sí.

La interacción método por concentración presentó diferencia significativa, porque los métodos evaluados a diferentes concentraciones son significativos entre sí y presenta un $p < 0.05$. Los métodos evaluados a baja concentración presentan diferencia significativa, mostrando superioridad del método de macerado con un 56.7% de mortalidad. De la misma forma a concentraciones medias los dos métodos presentan diferencia significativa, predominando el método macerado al presentar un 93.3% de mortalidad contra un 26.7% del método hemolinfa. Esto se puede atribuir a la calidad, pureza, concentración y tipo de la bacteria presente en el tracto digestivo del nematodo entomopatógeno *Photorhabdus luminescens*. La bacteria aislada de las larvas de *Galleria mellonella* infectadas por nematodos entomopatógenos, presentan una bacteria ya establecida y diluida entre los tejidos y componentes del hemocele de la larva. A pesar de que a altas concentraciones no presenta diferencia significativa al porcentaje de mortalidad, esto se atribuye a sobredosisificación suministrada a cada larva. Por lo tanto, observamos un mayor control a partir de la bacteria aislada por el método de macerado.

4. CONCLUSIONES

- Se definió parámetros como cantidad de nematodos a macerar y lugar de extracción de la hemolinfa para cada uno de los métodos. La cantidad óptima de nematodos a macerar es de 20,000 y el sexto y séptimo inter segmento, el lugar óptimo para extracción de hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella*.
- Se determinó mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* infectados con la bacteria *Photobacterium luminescens* aislada por método de macerado evidenciándose su potencial patogénico superior a la bacteria aislada por el método de hemolinfa.

5. RECOMENDACIONES

- Caracterizar molecularmente la bacteria *Photorhabdus luminescens* aislada.
- Utilizar el método de maceración como método de partida, en los estudios futuros a realizar con respecto a la reproducción artificial de *Heterorhabditis bacteriophora*.
- Estudiar la producción *in vitro* sólido o líquido con la bacteria *Photorhabdus luminescens* aislada.
- Definir parámetros de almacenamiento y renovación de la bacteria.

6. LITERATURA CITADA

David, R. 2012. The two faces of *P. luminescens*. (En línea). Consultado el 16 de septiembre del 2013. Disponible en <http://www.readcube.com/articles/10.1038/nrmicro2851?locale=en>

Eleftherianos, I; S. Boundy; S.A. Joyce; S. Aslam; J. W. Marshall; R. J. Cox; T. J. Simpson; D. J. Clarke; R.H. French-Constant; S.E. Reynolds. 2006. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. Columbus, Ohio.

Fernández, E, Arteaga, E y Pérez, M. Utilización de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas (en línea). Consultado el 10 de octubre del 2013. Disponible en <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm>

Grewal, Parwinder S.; Ehlers, Ralf-Udo.; Shapiro-Ilan, David I. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI published USA. 513 p.

Henríquez, P. 2002. Glosario de términos útiles para el manejo de recursos fitogenéticos. San Salvador, El Salvador. 80 p.

Nicholls Estrada, C. I. 2008. Control biológico de insectos, un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia. Colombia. 150 p.

Poinar, Jr, G, O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Entomopathogenic nematodes in biological control. p. 23 – 61.

Rosales, L. C.; M. G, Rodriguez H.; R. Enrique; L. Puente; J. Garcia, 2009. Cría masiva de nematodos para el control de insectos plagas (en línea). San Jose de las Lajas, Cuba. Consultado 25 agosto 2013. Disponible en http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%2012/12rosales_1.pdf

Sáenz E.A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. Colombia. 26 (2).

Sotelo Rivera, F.J.; G. Peña Chora; V.M. Hernández Velásquez; L. P. Lina Garcia. Las plagas bajo control: nematodos entomopatógenos. 2013. Morelos. México.

Vázquez Valdés, A. A; L. Audevert, M.E. Márquez Gutiérrez; M. Gómez Pacheco. 2005. Fitosanidad: Influencia de la composición de diferentes medios de cultivo en la reproducción de *Photorhabdus luminescens*. Cuba. 9(2). 68 p.