

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA SUR

**DIVISIÓN DE DESARROLLO REGIONAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**



**EVALUACIÓN PATOGENICA DE TRES CEPAS DE NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL PICUDO DE LA CAÑA DE
AZÚCAR *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal**

T E S I S

**PRESENTADO POR EL SUSTENTANTE:
ING. SANTIAGO TAPIA ALEJO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

DIRECTOR

Dr. Grifaldo Alcántara Pedro Fabián

CODIRECTOR

Dr. Palomares Pérez Martín

ASESORES

Dr. Acuña Soto Jesús Alberto

Dra. Hueso Guerrero Eva Judith

Autlán de Navarro, Jalisco
Mayo 2024

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	9
2.	OBJETIVOS	12
2.1.	OBJETIVO GENERAL	12
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
3.	HIPÓTESIS	12
4.	MARCO TEÓRICO	13
4.1.	CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	13
4.1.1.	Taxonomía de la caña de azúcar.....	13
4.1.2.	Morfología de la caña de azúcar.....	13
4.2.	ENFERMEDADES Y PLAGAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR	15
4.2.1.	Barrenador del tallo (<i>Diatraea saccharalis</i> y <i>Eourema</i> spp.).....	15
4.2.2.	Mosca pinta (<i>Aeneolamia</i> spp. y <i>Prosapia</i> spp.).....	16
4.2.3.	Pulgón amarillo (<i>Melanaphis sacchari</i> Zehntner).....	16
4.2.4.	Rata de campo (<i>Sigmodon hispidus</i> y <i>Oryzomys couesi</i>).....	17
4.2.5.	Complejo de la gallina ciega (<i>Phyllophaga</i> spp., <i>Anomala</i> spp. y <i>Ciclocephala</i> spp.)	17
4.2.6.	PICUDO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (<i>Apinocis subnudus</i> Buchanan, <i>Metamasius hemipterus</i> Oliver y <i>Sphenophorus incurrens</i> Gyllenhal).....	18
4.2.7.	<i>Sphenophorus incurrens</i> Gyllenhal	19
4.2.8.	Daños en la planta	21
4.2.9.	Presencia de <i>Sphenophorus incurrens</i> Gyllenhal en Jalisco	22
4.3.	ESTRATEGIAS DE CONTROL	23
4.4.	CONTROL QUÍMICO	23
4.5.	CONTROL BIOLÓGICO	23
4.5.1.	HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	23
4.5.2.	NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEP's)	24
4.5.3.	CONTROL DE PICUDOS CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1.	RECOLECTA DE INSECTOS ADULTOS <i>Sphenophorus incurrens</i> Gyllenhal.....	28
6.	EXPERIMENTO 1.....	31

6.1.	BIOENSAYO DE LABORATORIO	31
6.1.1.	Aislamiento de nematodos entomopatógenos	31
6.1.2.	Multiplicación de nematodos entomopatógenos	32
6.1.3.	Cosecha de nematodos	33
6.1.4.	Almacenamiento y conservación de los NEP	34
6.1.5.	Experimento 1. Concentración letal media (CL50) y tiempo letal medio (TL50).....	35
6.1.6.	Evaluación de mortalidad.....	36
6.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL	36
6.3.	RESULTADOS	37
6.4.	DISCUSIÓN	40
6.5.	CONCLUSIÓN	44
7.	LITERATURA CITADA.....	45

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Sphenophorus incurrens</i>	19
Figura 2. <i>Sphenophorus incurrens</i> Gillenhal	20
Figura 3. Estadios de <i>Sphenophorus incurrens</i> Gillenhal	20
Figura 4. Daños por <i>S. incurrens</i> Gillenhal.	21
Figura 5. Parcela con daño de <i>S. incurrens</i> Gillenhal	22
Figura 6. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.....	25
Figura 7. <i>Photorhabdus luminescens</i> colonizando el intestino del nematodo <i>H. bacteriophora</i> .	26
Figura 8. Parcela el Grullo con daños de <i>S. incurrens</i> Gillenhal.	28
Figura 9. Preparación de trampas para para picudo	29
Figura 10. Colocación de trampas como atrayentes <i>S. incurrens</i> Gillenhal en parcela de caña...	29
Figura 11. Revisión de trampas y colecta de picudos.....	30
Figura 12. Laboratorio de biotecnología en el edificio de posgrado del Centro Universitario de la Costa Sur.....	31
Figura 13. Larvas de <i>Galleria mellonella</i>	32
Figura 14. Reproducción de nematodos entomopatógenos en larvas de <i>Galleria mellonella</i>	33
Figura 15. Trampa White para obtención de NEP	34
Figura 16. Conservación de NEP a temperatura de $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$	34
Figura 17. Bioensayos en caja de tejido de 12 cavidades.....	35
Figura 18. Placas de cultivo de tejidos para cada tratamiento de NEP's ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
Figura 19. CL50 de tres cepas nativas de NEP's	36
Figura 20. TL50 de tres cepas nativas de NEP's..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	

RESUMEN

En México, la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos agroindustriales de gran importancia económica, el picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal causa daños importantes en tallo y raíz de la planta disminuyendo su calidad y rendimiento, en donde el uso de insecticidas químicos para su control ha sido insuficiente. El control biológico a través del uso de nematodos entomopatógenos se ha comenzado a utilizar en muchos países obteniendo excelentes resultados contra diferentes plagas del suelo. Sin embargo, en Jalisco, México, no hay estudios hacia las especies de picudos presentes en el cultivo de la caña de azúcar. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* la patogenicidad de tres cepas nativas de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis* spp. (NEP's) para el control de *S. incurrens* en Autlán de Navarro, Jalisco, México.

Para esta investigación, se utilizaron tres cepas nativas de NEP's, aisladas por el Dr. Pedro Fabián Grifaldo Alcántara: *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco, área de ganado bovino, municipio de la Huerta, Jalisco, ubicado geográficamente entre las coordenadas latitud: 19° 20' 30" y 19° 45' 50" N y longitud: 104° 31' 50" y 105° 13' 20" O, *Heterorhabditis* sp. El Mentidero, extraído del cultivo de pepino en la localidad de El Mentidero (Telesecundaria Venustiano Carranza) y *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19), del cultivo de la caña de azúcar localidad del Mentidero ubicada entre las coordenadas latitud: 19°46'15.919" N y longitud: 104°17'35.257" O, municipio de Autlán de Navarro, Jalisco, México.

Para la reproducción y multiplicación de NEP's se realizó la infección de larvas del 3^{er} y 4^o instar de *Galleria mellonella* L. La colecta de *S. incurrens* en estado adulto se llevó a cabo entre los meses de febrero a junio del 2022, utilizando la metodología implementada en el Ingenio de Atencingo, Puebla. Se colocaron 250 trampas atrayentes dispuestas en una hectárea en el cultivo de caña de azúcar con daños presentes por esta plaga. Las colectas del picudo *S. incurrens* fueron trasladadas en un recipiente de plástico acondicionado al laboratorio de Biotecnología de Posgrado del Centro universitario de la Costa Sur de la Universidad de Guadalajara donde se llevaron a cabo los experimentos. La cuantificación para las infecciones de nematodos se realizó a través de una contabilización volumétrica. Para el montaje de los experimentos se utilizó placas para cultivo celular de poliestireno – estéril 12 pozos, analizando la concentración media letal (CL₅₀) y del

tiempo medio letal (TL₅₀) a través de Análisis Probit, teniendo ocho tratamientos (control = 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, y 5000 juveniles infectivos) y tres repeticiones por tratamiento por cada cepa nativa de NEP's. Cada uno de los tratamientos estuvo conformado por 12 insectos adultos, haciendo un total de 36 unidades experimentales. Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas a partir de la inoculación de las concentraciones de NEP's por un periodo de diez días.

Los resultados de laboratorio para las tres cepas evaluadas de NEP's son considerados patogénicas, ya que todas causan la muerte al picudo de la caña de azúcar *S. incurrens* en un tiempo de 1 a 28 días. De acuerdo al 95% IC de la concentración media letal (CL₅₀) del aislado *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco fue de 2626JI/picudo, con un límite inferior de 1084 JI/picudo y un límite máximo de 15288 JI/picudo, la CL₅₀ de *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) 11558JI/picudo, con un límite inferior de 3540 JI/picudo y un límite máximo de 192990 JI/picudo y la CL₅₀ de *Heterorhabditis* sp. el Mentidero 69167JI/picudo, con un límite inferior de 7394 JI/picudo y un límite máximo de 122675JI/picudo. Con el 95% IC del tiempo letal medio (TL₅₀) con *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco fue de 17.8 días, con un límite inferior de 14.8 días y máximo de 22.8 días. El TL₅₀ con *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) fue de 28.2 días, con un límite inferior de 14.8 días y máximo de 22.8 días y el CL₅₀ de *Heterorhabditis* sp. el Mentidero fue de 26 días, con un límite inferior de 20.1 días y máximo de 30.1 días. En las evaluaciones realizadas en esta investigación se observó que existe una relación sobre la cantidad de nematodos y el aumento en la mortalidad de la plaga, así como los días que interactúan entre ellos. Así la susceptibilidad de los hospederos puede variar entre las especies o cepas de nematodos que se evalúan y los mecanismos que estos poseen, así después de una infección, las progenies de estos aislados podrán comenzar a tener una mayor mortalidad.

A manera de conclusión, el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco presentó una mayor agresividad hacia el picudo adulto de la caña de azúcar *S. incurrens*, y podría representar como una mejor alternativa de control biológico con el uso de NEP's para condiciones de laboratorio y, quizá, en condiciones de campo. Además, se mostró que los otros dos aislamientos también tuvieron un efecto patogénico hacia *S. incurrens*.

Palabras clave: Control biológico, plagas, CL₅₀, TL₅₀, virulencia.

ABSTRAC

In Mexico, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the agroindustrial crops of great economic importance. The sugarcane weevil *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal causes significant damage to the stem and root of the plant, reducing its quality and yield. Where in addition the use of chemical insecticides for its control has been insufficient. Biological control through the use of entomopathogenic nematodes has begun to be used in many countries, obtaining excellent results against different soil pests. However, in Jalisco, México, there are no studies on the species of weevils present in sugarcane cultivation. Therefore, the objective of the present study was to evaluate in vitro the pathogenicity of three native strains of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. (NEP's) for the control of *S. incurrens* in Autlán de Navarro, Jalisco, México.

For this research, three native NEP's strains were used, isolated by Dr. Pedro Fabián Grifaldo Alcántara: *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco, cattle area, municipality of La Huerta, Jalisco, geographically located between the coordinates latitude: 19° 20' 30" and 19° 45' 50" N and longitude: 104° 31' 50" and 105° 13 ' 20" O, *Heterorhabditis* sp. El Mentidero, extracted from the cucumber crop in the town of El Mentidero (Telesecundaria Venustiano Carranza) and *Heterorhabditis* bacteriophora (JAAN-19), from the sugar cane crop in the town of Mentidero located between the latitude coordinates: 19°46'15.919" N and longitude: 104°17'35.257" W, municipality of Autlán de Navarro, Jalisco, México.

For the reproduction and multiplication of NEP's, the infection of 3rd and 4th instar larvae of *Galleria mellonella* L. was accomplished. The collection of *S. incurrens* in the adult state was carried out between the months of February to June 2022, using the methodology implemented at the Atencingo Mill, Puebla. 250 attractant traps were placed on one hectare in the sugarcane crop with damage caused by this pest. The collections of the weevil *S. incurrens* were transferred in a conditioned plastic container to the Postgraduate Biotechnology laboratory of the University Center of the South Coast of the University of Guadalajara where the experiments were developed. Quantification for nematode infections was performed through volumetric counting. To set up the experiments, 12-well sterile polystyrene cell culture plates were used, analyzing the half-lethal concentration (CL₅₀) and the half-lethal time (TL₅₀) through Probit Analysis, having eight treatments (control = 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, and 5000 infective juveniles) and three

repetitions per treatment for each native NEP's strain. Each of the treatments consisted of 12 adult insects, making a total of 36 experimental units. The evaluations were developed every 24 hours from the inoculation of the NEP's concentrations for a period of ten days.

The laboratory results for the three NEP's strains evaluated are considered pathogenic, since all of them cause death to the sugarcane weevil *S. incurrens* in a period of 1 to 28 days. According to the 95% CI of the mean lethal concentration (CL_{50}) of the isolate *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco was 2626JI/weevil, with a lower limit of 1084 JI/weevil and a maximum limit of 15288 JI/weevil, the CL_{50} of *Heterorhabditis* bacteriophora (JAAN-19) 11558JI/weevil, with a lower limit of 3540 JI/ weevil and a maximum limit of 192990 JI/weevil and the CL_{50} of *Heterorhabditis* sp. the Mentidero 69167JI/weevil, with a lower limit of 7394 JI/weevil and a maximum limit of 122675JI/weevil. With the 95% CI of the median lethal time (TL_{50}) with *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco was 17.8 days, with a lower limit of 14.8 days and maximum of 22.8 days. The TL_{50} with *Heterorhabditis* bacteriophora (JAAN-19) was 28.2 days, with a lower limit of 14.8 days and maximum of 22.8 days and the CL_{50} of *Heterorhabditis* sp. the Mentidero was 26 days, with a lower limit of 20.1 days and a maximum of 30.1 days. In the evaluations carried out in this research, it was observed that there is a relationship between the number of nematodes and the increase in pest mortality, as well as the days that they interact between them. Therefore, the susceptibility of the hosts may vary between the species or strains of nematodes that are evaluated and the mechanisms that they possess, thus after an infection, the progenies of these isolates may begin to have a higher mortality.

In conclusion, the isolate *Heterorhabditis* sp. El Casco showed greater aggressiveness towards the adult sugarcane weevil *S. incurrens*, and could represent a better alternative for biological control with the use of NEP's for laboratory conditions and, perhaps, in field conditions. Furthermore, it was shown that the other two isolates also had a pathogenic effect towards *S. incurrens*.

Keywords: Biological control, pests, CL_{50} , TL_{50} , virulence.

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) a nivel mundial es considerado uno de los cultivos agroindustrial más importantes en la economía de muchas regiones, por su versatilidad y gran adaptación a diferentes condiciones ambientales (López *et al.*, 2016). A nivel Nacional, Jalisco se encuentra en segundo lugar en la producción de caña de azúcar superado por Veracruz, en donde estas dos entidades aportan el 50.6 % de azúcar del país (CNIA, 2018). El estado de Jalisco tiene seis ingenios con una superficie de 83 mil 629 hectáreas en los municipios de: San Francisco (Ameca), Bellavista (Bellavista), José María Morelos (Casimiro Castillo), Tala (Tala), Tamazula (Tamazula) y el ingenio Melchor Ocampo (Autlán de Navarro) el cual está conformado por una superficie de 11 mil 518 hectáreas de caña de azúcar, con una producción en la zafra 2021-2022 de 119.8 toneladas por hectárea (CONADESUCA, 2022).

Las plagas y enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los factores negativos para la producción de azúcar, los cuales afectan considerablemente su rendimiento, teniendo identificados alrededor de 150 especies de organismos que dañan a este cultivo, siendo principalmente insectos, roedores, bacterias y virus (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014).

La caña de azúcar es un cultivo extensivo, por lo que es común encontrar diversas especies de insectos plaga que afectan la producción y calidad, tales como las termitas *Heterotermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae), barrenadores del tallo *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae), mosca pinta *Aeneolamia* y *Prosapia* spp., (Hemiptera: Cercopidae), gallina ciega *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), pulgón amarillo (*Sipha flava* Forbes) (Hemiptera: Aphididae), chinche de encaje (*Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer) (Hemiptera: Tingidae), picudo (*Anacetrinus* spp., *Metamasisu* spp., y *Limnobaris* spp.) (Coleoptera: Curculionidae) y la rata de campo (*Sigmodon* sp. y *Oryzomys* sp.), cuyos daños oscilan entre 3 a 10 toneladas por hectárea de pérdidas según la región (Pantaleón *et al.*, 2012).

En muestreos llevados a cabo en la Región Sierra de Amula al suroeste del estado Jalisco, México, en los meses de enero y junio del año 2020, dentro de las áreas de influencia del Ingenio Melchor Ocampo S.A. de C.V., se detectó la presencia del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus Incurrens* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) ubicado principalmente en las localidades de las

Paredes y Ayuquila pertenecientes a Autlán de Navarro y el Grullo, Jalisco, obteniendo mayores densidades de colectas en los meses de marzo a junio (Beterán, 2021).

Los daños de esta plaga pueden ser directos e indirectos; los directos son a través del consumo del tejido vegetal por las larvas y adultos que hacen galerías de forma irregular en los tallos y continúan después de la zafra afectando las raíces donde se siguen alimentando, mientras que el indirecto es por medio de galerías que facilitan la entrada de bacterias y hongos los cuales disminuyen la calidad de los azúcares, llegando a producir pérdidas de 20 a 30 toneladas por hectárea (ton/ha) (Barreto-Triana *et al.*, 2014).

En la agricultura actual tanto a nivel nacional como internacional, se ha visto comprometida con el empleo de insumos químicos, teniendo la intención de alcanzar altos rendimientos productivos y cubrir las necesidades de los países (Martínez y Huerta, 2018). Por lo tanto, el control principal del picudo de la caña de azúcar es a través del uso de productos químicos, los cuales son costosos, contaminan el ambiente y generan riesgos para la alimentación y la salud humana (González *et al.*, 2007).

El control biológico, es una alternativa de control de plagas agrícolas, otorgando beneficios a la economía de los agricultores, protección al ambiente y la salud de los consumidores, además de que contribuye a la agricultura sustentable de México y de muchos otros países (Arredondo, 2008).

Dentro de este método de control existe el uso de depredadores como agentes de control biológico siendo una alternativa del manejo de plagas que está ligado al conocimiento, taxonomía y biología del depredador, su especificidad y sus tasas de depredación, cuyas características principales son el ser generalistas y no específicos, así como alimentarse de un gran número de individuos (Gutiérrez, 2013). Un ejemplo importante es el uso de las hormigas depredadoras como *Pheidole megacephala* Fabricius y *Tetramorium guineense* Bernard (Hymenoptera: Formicidae) que han sido utilizadas para el control del picudo del plátano (Castiñeiras *et al.*, 1990).

Otros organismos utilizados en el control biológico son los insectos parasitoides, los cuales atacan a sus hospederos en sus diferentes estadios de su desarrollo; siendo insectos de suma importancia para el control biológico. En su estado libre se alimentan de miel, néctar o polen. Sus características principales son específicos en cuanto a su hospedero y de menor tamaño que ellos, la hembra es quien busca al hospedero, varias especies de parasitoides pueden atacar las diferentes etapas del

ciclo de vida del hospedero y los huevos o larvas son puestos cerca, dentro o en la superficie del hospedero (Nicholls, 2008).

Son diversas especies de parasitoides las que han sido un éxito en la reducción de insectos plaga, pero algunas especies que destacan son *Bracon* sp., *Triaspis eugenii* Wharton y Lopez-Martinez (Hymenoptera: Braconidae), *Ceratoneura petiolata* Ashmead, *Baryscapus* sp., *Eupelmus cushmani* (Ceauford) y *Eurytoma tylodermatis* Ashmead (Hymenoptera: Eulophidae) (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2012).

Existe otro tipo de control que está tomando auge en el campo agrícola, utilizando organismos entomopatógenos como bacterias, virus, hongos y nematodos, los cuales son potencialmente útiles como agentes de control contra insectos plaga, causándole enfermedades infecciosas y posteriormente la muerte (Bahena, 2008). Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, el uso de este control es una alternativa que se ha venido abriendo espacio en los programas de manejo de plagas en caña de azúcar.

Actualmente se conocen más de 700 especies de hongos que afectan a insectos de diversos órdenes (Devoto, Gerding y France, 2003). Los grupos de hongos más utilizados para control de plagas del suelo son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con los cuales se ha obtenido excelentes resultados (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004). Sin embargo, los nematodos entomopatógenos (NEP's) es otro grupo de entomopatógenos que poseen un potencial de control de plagas y que han sido empleados en América del Norte, Europa, Asia y Australia para el control de plagas de suelo con buenos resultados en ambientes críticos. Estos nematodos, poseen características benéficas que los hacen más promisorios para su uso como es el de tener una buena capacidad de adaptación a nuevos ambientes, facilidad de moverse en el suelo en búsqueda de su hospedero y causarle la muerte en 48hrs., además de que no dañan al medio ambiente ni a la salud humana (Rosales *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la patogenicidad *in vitro* de tres cepas de nematodos entomopatógenos nativos contra el picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración letal media (DL₅₀) de tres cepas de NEP's sobre el picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el tiempo letal medio (TL₅₀) de tres cepas de nematodos entomopatógenos nativos sobre adultos del picudo de la caña *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal en condiciones de laboratorio.

3. HIPÓTESIS

- Las tres cepas de nematos entomopatógenos presentarán un efecto positivo en la patogenicidad hacia el picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal.
- Al menos una de las tres cepas nativas evaluadas tendrá un efecto mayor al 50 % de adultos muertos sobre el picudo *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal en condiciones de laboratorio.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea la cual fue traída desde su lugar de origen en Asia por los árabes y especialmente en la India, a distintas partes de África y Europa, siguiendo el rumbo de los movimientos migratorios, las invasiones y el comercio del Mediterráneo. La caña de azúcar se trasladó a la península Ibérica siendo Valencia y Granada como principales regiones de mayor producción. A la llegada de Cristóbal Colón a América por segunda vez en 1493 entre una gran variedad de animales y vegetales introdujo la caña de azúcar lo que ha sido denominado como “el más grande regalo del Viejo al Nuevo Mundo” (Ortega, 1993). De acuerdo a Maturana y Restrepo (1970), la introducción de la caña de azúcar a México procedente de Cuba, la realizó Hernán Cortés, siendo sus inicios en el estado de Veracruz en el año de 1522.

4.1.1. Taxonomía de la caña de azúcar

Según Takhtajan, (1980) la clasificación taxonómica de la Caña de Azúcar es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Cormobionta

División: Magnoliophytina

Clase: Liliatae

Orden: Poales Familia: Poaceae (Gramíneas)

Tribu: Andropogoneae

Género: *Saccharum*

Especie: *officinarum*

Nombre Científico: *Saccharum officinarum*

4.1.2. Morfología de la caña de azúcar

4.1.2.1. La raíz

Es la parte subterránea de la planta, su función principal es absorber agua y nutrientes, además de brindar soporte y anclaje (Ávila, 2011). Presenta dos tipos de sistemas radiculares, el primero que es temporal se conoce como adventicio y se forma a partir de la banda radicular de la estaca, son raíces muy delgadas ramificadas y su periodo de vida dura hasta el momento que aparecen las

raíces de los nuevos brotes o tallos (Amaya *et al.*, 1995). Tienen como función absorber el agua para facilitar la hidrólisis de los carbohidratos contenidos entre el entrenudo. El segundo tipo, que es definitivo, se denomina permanente y se origina a partir de la banda radicular de los brotes o tallos (López, 2015).

4.1.2.2. El tallo

Es el órgano donde se almacenan los carbohidratos, se forma a partir de la germinación de las yemas, a su vez, del tallo principal emergen nuevos brotes denominados tallos secundarios y terciarios, formando el macollamiento (Subirós, 1995). Los tallos tienen diferentes hábitos de crecimiento, estos pueden ser en forma de ángulo abierto, curvados, postrados y en estado intermedio, lo perfecto es que se desarrollen de forma erecta; están formados por nudos y entrenudos, cubiertos por una vaina foliar, dependiendo de la variedad y de las condiciones edafoclimáticas, estos pueden tener un tamaño entre 1.50 a 4.00 metros de longitud, y generalmente son de color verde, amarillo, rojo o morado (Dávila, 2014).

4.1.2.3. La hoja

Las hojas brotan de los nudos del tallo alternadamente, conformando dos filas opuestas en el mismo plano. A medida que las hojas crecen, se dividen del eje del tallo y adoptan la postura inclinada que las caracteriza, la cual está estrechamente ligada a la variedad de la cual depende el aprovechamiento de la energía solar (Esaú, 2019). Son alternadas, largas, delgadas, planas y pubescentes, conformadas por vaina y limbo, miden entre 0.90 a 1.5 metros de largo y de 1 a 10 centímetros (cm) de ancho, durante su vida vegetativa pueden tener de 10 a 15 hojas, dependiendo de la variedad y condiciones ambientales (Burgos, 2015; Rivera, 2008).

4.1.2.4. La Flor

La inflorescencia es la panícula abierta y ramificada, se presenta en forma de espiga o flecha, la misma que varía de acuerdo a las variedades. Es hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Cada flor está rodeada por pubescencias largas que le dan a la florescencia un aspecto sedoso. En cada ovario hay seis óvulos el cual, una vez fertilizado da origen al fruto o cariósipide que es lo que comúnmente se conoce como semilla (Helfgott, 2016).

4.2. ENFERMEDADES Y PLAGAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR

Las plagas y enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los factores negativos para la producción de azúcar, que afectan su rendimiento, se tienen identificados alrededor de 150 especies que dañan a este cultivo, principalmente insectos, roedores, bacterias y virus (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014).

Es un cultivo extensivo y perenne, por lo que es común encontrar insectos plaga que afectan la producción y calidad del producto. Las principales plagas son: termitas *Heterotermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae), barrenadores del tallo *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae), mosca pinta *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae), el complejo gallina ciega *Phyllophaga* spp. *Anomala* spp. y *Ciclocephala* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), pulgón amarillo (*Sipha flava* Forbes), (Hemiptera: Aphididae), chinche de encaje (*Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer), picudo de la caña (*Anacentrinus* spp., *Metamasium* spp., *Sphenophorus* spp. y *Limnobaris* spp.), (Coleoptera: Curculionidae) y la rata de campo (*Sigmodon* sp. y *Oryzomys* sp.), (Rodentia: Muridos) cuyos daños oscilan entre 3 a 10 ton/ha de perdidas según la región (Pantaleón *et al.*, 2012).

4.2.1. Barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis* y *Eourema* spp.)

Los daños de los barrenadores del tallo de la caña de azúcar del género *Diatraea* spp. y *Eourema* spp., inician desde la etapa temprana de crecimiento de la caña llamada “pelillo”, es importante destacar que el tipo de daño en la caña es diferente entre estas dos especies, sin embargo, las especies de *Diatraea* se alimentan longitudinalmente perforando uno o más entrenudos según la consistencia del tallo, expulsando el excremento hacia afuera dejando limpio el túnel, lo que produce un síntoma de “aserrín” en el exterior de los tallos y base de las hojas, en contraste *Eourema* spp. barrena el tallo en ambos sentidos longitudinal y transversalmente en las proximidades del nudo, empaquetando el excremento en el interior del túnel por lo que es difícil de distinguir (Rodríguez, 2014).

Estos géneros poseen metamorfosis holometábola o completa y se caracterizan por presentar un desarrollo biológico en fases, las mismas que están comprendidas por los estados: huevo, larva, pupa y adulto (Collazo, 1984). Las larvas, cuando infestan cañas jóvenes, causan la muerte de la

yema apical, esto produce una coloración amarilla y casi la muerte de los verticilos internos de las hojas, es un síntoma conocido como “corazón muerto” (Gómez y Vargas 2014).

En las cañas más antiguas, los túneles de los barrenadores ocasionan que las puntas se mueran y se debiliten los tejidos de sostén, de tal manera que los tallos se rompen con los vientos fuertes. Esta plaga puede infestar los tallos de caña en cualquiera de sus etapas de crecimiento, desde que brota hasta la madurez (Gómez y Vargas, 2014), teniendo, además, que tras la alimentación de sus larvas, incita a la proliferación de hongos tales como *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium* spp. y *Nigrospora* spp. (Joyce *et al.*, 2016).

4.2.2. Mosca pinta (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.)

Es originaria del continente americano y tienen relación coevolutiva con los pastos, al introducirse este cultivo de la caña de azúcar a México estos insectos la tomaron como una planta hospedera y presentan metamorfosis incompleta, los cuales pasan por los estados de huevo, cinco estadios ninfales y adulto (Castro *et al.*, 2005). El adulto al alimentarse inyecta una toxina en las hojas, la cual “quema” el follaje, por lo que la planta pierde el área fotosintética y con ella detiene su crecimiento (Sáenz *et al.*, 1999).

Las hembras de mosca pinta depositan sus huevos alrededor de las cepas de la caña, enterrados a unos pocos centímetros de profundidad (Fernández y Ramos, 1986; Flores, 1994). Algunos huevos entran en estado de diapausa, estado de suspensión que les permite pasar el periodo de sequía exitosamente en el suelo y eclosionar hasta la siguiente época de lluvias (Estrada *et al.*, 2003). El daño por este insecto plaga puede ser cuantioso y se estiman principalmente en las pérdidas en rendimiento que oscilan entre 5 y 20 ton/ha (De la Cruz *et al.*, 2005).

4.2.3. Pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari* Zehntner)

Este insecto también conocido como el áfido de la caña de azúcar, plaga originaria de África, pero que actualmente se encuentra distribuida en Asia, Australia y América. Su daño principal es directo a la planta, en donde este áfido es considerado un vector de enfermedades virales; como el virus del mosaico de la caña de azúcar, virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, entre otras muchas

enfermedades (Singh *et al.*, 2004). El pulgón amarillo de la caña de azúcar *Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae), se alimenta de la savia que absorbe del xilema (Colares *et al.*, 2015). *M. sacchari* puede alcanzar los 30,000 individuos/planta, lo que ocasiona desórdenes fisiológicos como arrugamiento y marchitamiento de la hoja, disminución del contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, azúcares y clorofila (Singh *et al.*, 2004).

4.2.4. Rata de campo (*Sigmodon hispidus* y *Oryzomys couesi*)

Uno de los principales problemas que disminuye la calidad y producción del cultivo de la caña de azúcar son los roedores, que dañan el tallo produciendo pérdidas económicas, ya que reduce el peso de la caña y las heridas producidas constituyen una puerta de entrada de microorganismos que afectan la producción, la calidad de los azúcares (Márquez *et al.*, 2002). Las principales especies de roedores son *Sigmodon hispidus* y *Oryzomys couesi* conocida comúnmente como rata cañera, (Ceballos *et al.*, 2005).

4.2.5. Complejo de la gallina ciega (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Ciclocephala* spp.)

El complejo de la gallina ciega está formado principalmente por las especies de mayor importancia del género *Phyllophaga* y de menor relevancia los géneros *Anomala* y *Ciclocephala* (Abarca *et al.*, 1992). El aspecto externo de las larvas del género *Phyllophaga* es prácticamente idéntico, sin embargo, es posible separarlos de otros géneros mediante las siguientes características: abertura anal en forma de “Y”, el décimo segmento abdominal con palidia bien desarrollada y carencia de esclerotización pronatal (King, 1994). El complejo de la gallina ciega es una plaga del sistema radicular de la caña de azúcar, en su estado larval se alimenta de la raíz de la planta lo que afecta las funciones normales, reduciendo la absorción de agua y nutrientes que resulta en pérdida de tonelaje y rendimiento de azúcar por hectárea, además de que se reduce el anclaje de la cepa lo que favorece su desprendimiento y se acorta la longevidad de la plantación. Los daños físicos producidos en las raíces favorecen la entrada de hongos y bacterias que aceleran el deterioro y pudrición del sistema radical (Márquez, 2011).

4.2.6. PICUDO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Apinocis subnudus* Buchanan, *Metamasius hemipterus* Oliver y *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal)

Los primeros reportes de *S. incurrens* en caña de azúcar datan de 1929 para el estado de Oaxaca (Flores, 1994). De acuerdo a Vaurie (1951, 1954), a las especies de *Sphenophorus* en México se les conoce como picudo o gorgojos, los primeros estudios morfológicos y molecular los realizó de colectas en zonas de influencia del ingenio Emiliano Zapata, Morelos y Santa Clara, Michoacán. Esta plaga ataca propiamente el cultivo de la caña de azúcar; sin embargo, en México, la especie reportada y que ha causado importancia económica es *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) (Segura *et al.*, 2013).

Para el estado de Veracruz, México, se registraron los primeros reportes de las especies *S. incurrens* y *Apinocis subnudus* Buchanan (Coleoptera: Curculionidae) (Fig. 1) en caña de azúcar (Saunders *et al.*, 1998). En México, *S. incurrens* se encuentra presente sobre la caña en los estados de Oaxaca, Puebla, Michoacán, San Luis Potosí y Morelos (Pérez *et al.*, 2014). Flores y Abarca (1961) registraron por primera vez la presencia de *A. subnudus* en los estados de Veracruz, Jalisco y Campeche, pero sin mencionar los sitios de colecta. En lo que se refiere a *M. hemipterus* L. (Coleoptera: Curculionidae) su distribución mundial se limita al Continente Americano, este insecto está presente en 19 países desde Estados Unidos de América hasta Argentina (Whitehead 1991, Sosa *et al.*, 1997, Anderson 2002).

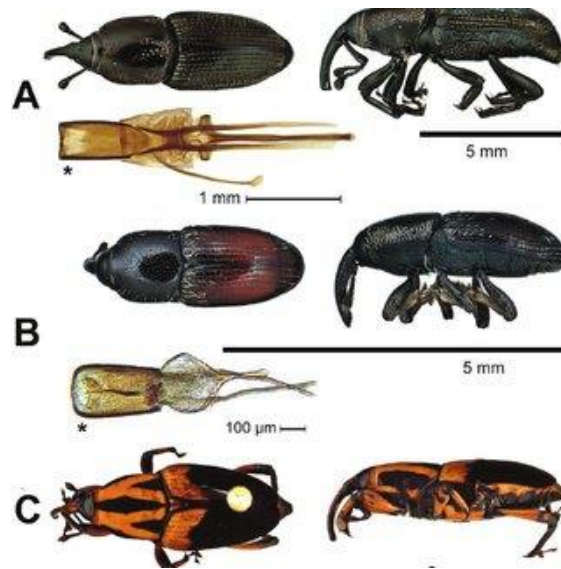


Figura 1. *Sphenophorus incurrens*. A, macho: vista lateral y edeago. B, *Apinocis subnudus*, macho: vista dorsal, lateral y edeago. C, *Metamasius hemiptherus*, hembra: vista dorsal y lateral (Fuente: Robert W. Jones).

Los picudos como plaga de la caña de azúcar dañan las cepas completas dejando manchones en el cultivo, sin embargo, los principales daños son por las larvas de estos insectos, los cuales penetran en la base y parte subterránea del tallo de la caña de azúcar realizando galerías en diferentes direcciones, permitiendo la entrada a bacterias fitopatógenas que provocan pudrición y flacidez de las raíces primarias y secundarias (García *et al.*, 2012), lo cual puede ocasionar pérdidas de 20 a 30 ton/ha (Barreto-Triana *et al.*, 2014).

4.2.7. *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal

4.2.7.1. Descripción y biología

Los adultos son de color negro brillante y de forma oval alargada, el macho tiene una longitud de 9 a 14mm y de 3.5 a 4.5mm de ancho (fig. 2), en donde la hembra puede alcanzar una longitud de 15mm y 6mm de ancho (Hernández *et al.*, 2012). Los machos pueden ser distinguidos por la presencia de puntuaciones que rodean una parte más brillante que asemeja una “M” en el pronoto (Vaurie, 1951).

Las hembras son de mayor tamaño en comparación con los machos y su dimorfismo sexual está basado principalmente en la parte terminal del abdomen; siendo en los machos más curvado que en las hembras, no obstante, la genitalia es un carácter definitivo para su separación (Segura-León

et al., 2014). Las hembras pueden copular varias veces (poliandricas) con el mismo macho o diferentes, teniendo así un éxito en su reproducción para tener hasta un 70% en el incremento de su fertilidad y fecundidad (Arnqvist *et al.*, 2004).

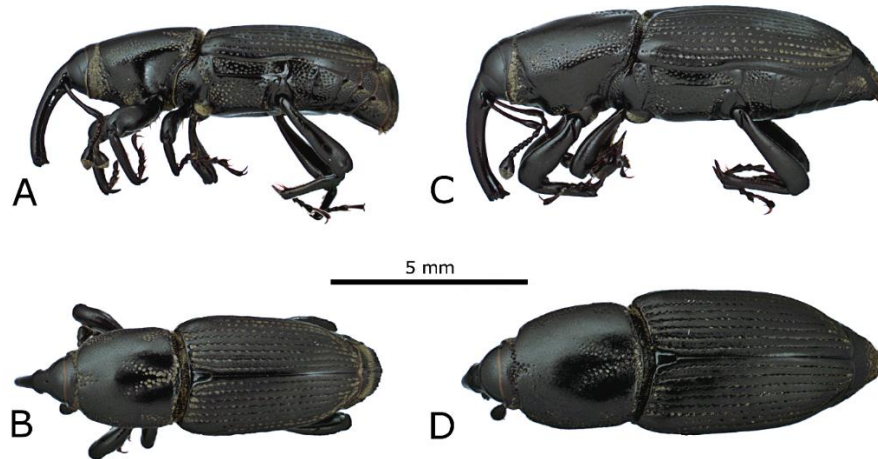


Figura 2. *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal.

A, Vista lateral del adulto macho. B, Vista dorsal del adulto macho. C, Vista lateral del adulto hembra. D, Vista dorsal del adulto hembra (Fuente: Obdulia Lourdes Segura León).

Los diferentes estadios (Fig.3) se pueden encontrar después de la quema y la zafra en las parcelas de caña de azúcar, en los tallos las pupas continúan su desarrollo y bajan hacia la raíz hasta alcanzar su estado adulto (Segura *et al.*, 2013).



Figura 3. Se muestra los diferentes estadios de *Sphenophorus incurrens* Gillenhal, huevo, larva, pupa y adulto (Fuente: Obdulia Lourdes Segura León). (Segura-León *et al.*, 2013).

4.2.8. Daños en la planta

Los adultos son atraídos principalmente a las cañas (socas) después del corte (Mendoza *et al.*, 2006). Los daños en los tallos de las cañas se pueden señalar que las hembras ponen los huevos de manera individual cercanos a la base de la planta (Fig. 4), estos son alargados y de color blanco marfil de 1.8 a 2 mm de longitud. Las larvas son de color blanco - amarillo lechoso, ápodas y con la cabeza de color café, los daños de este insecto son directos e indirectos: directos por el consumo del tejido vegetal por las larvas y adultos que hacen galerías de forma irregular en los tallos y continúan después de la zafra afectando las raíces donde se siguen alimentando hasta morir la cepa y el daño indirecto a través de estas galerías facilitando la entrada de bacterias y hongos que disminuyen la calidad de los azúcares (Segura-León *et al.*, 2013).



Figura 4. Daños por *Sphenophorus incurrens* Gillenhal en donde se muestran: A, daños por picado adulto en el tallo. B, síntomas de plantas dañadas. C, brotes secos. D, cepas muertas de la caña de azúcar.

Los adultos tienen poca capacidad de vuelo y son sensibles a los movimientos, por lo que al momento de remover el suelo se quedan inmóviles por un momento, probablemente como una medida de escape de los depredadores (Segura *et al.*, 2014). Estos insectos prefieren zonas oscuras y húmedas, se les puede encontrar dentro de los tallos, en las axilas de las hojas o enterrados en las raíces, donde se encuentran larvas de diferentes estadios, pupas, adultos conviviendo y alimentándose. El daño que causan es intenso y por sus hábitos gregarios su daño se presenta en forma de manchones (Fig.5), en las parcelas sembradas con caña (Glibin *et al.*, 2000; Girón-Pérez *et al.*, 2009).

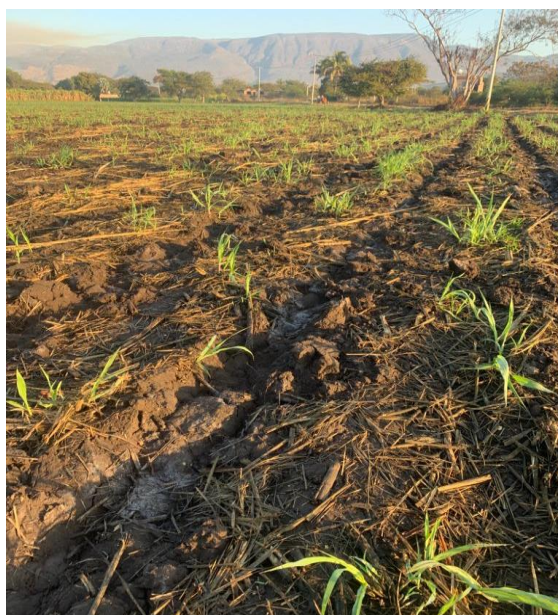


Figura 5. Parcela con manchones y falta de cepas por daño de *Sphenophorus incurrens* Gillenhal dentro del cultivo de la caña de azúcar.

4.2.9. Presencia de *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal en Jalisco

Muestras llevadas a cabo en la Región Sierra de Amula al suroeste del estado Jalisco, México, en los meses de enero y junio del año 2020, dentro de las áreas de influencia del Ingenio Melchor Ocampo S.A. de C.V., se detectó la presencia del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens*, ubicado principalmente en las localidades de las Paredes y Ayuquila pertenecientes a Autlán de Navarro y el Grullo, obteniendo mayores densidades de colectas en los meses de marzo a junio (Beterán, 2021).

4.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL

4.4. CONTROL QUÍMICO

El control principal del picudo de la caña de azúcar es a través de productos químicos aplicados de manera preventiva durante la siembra como el Endosulfan (Counter 5G[®]), Bifentrina (Brigadier 5G[®]) a una dosis de 20 k/ha y en plántula (1-2 meses) con un porcentaje de mortalidad del adulto del de Finipronil[®] de 60%, Imidacloprid[®] 82% y Tiametoxam[®] 90%, demostrando este último ser más eficaz (CICOPLAFEST, 2004). Sin embargo, las aplicaciones de productos químicos contra el picudo no han tenido tanto éxito debido a que las larvas se encuentran en el interior de los tallos y raíces de las plantas (Cerdeira *et al.*, 1999).

En busca de alternativas al control químico, se realizan numerosas investigaciones mediante el uso de enemigos naturales utilizados para el control biológico de plagas agrícolas que, además de mantener la población de una plaga a un nivel en el cual no cause un daño económico, también reducen el impacto ambiental y contribuye a la preservación de la diversidad a través de una menor presión sobre las especies (Gómez 1995).

4.5. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es un servicio del ecosistema mediante el cual los organismos plaga son reducidos por enemigos naturales, este tipo de control se produce en todos los ecosistemas del mundo, ya sea naturales o en los ecosistemas agrícolas, desde un punto económico y ambiental es la mayor contribución a la agricultura (Lenteren *et al.*, 2019).

4.5.1. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

El uso de hongos entomopatógenos es una alternativa que se ha venido abriendo espacio en los programas de manejo de plagas de caña de azúcar, actualmente se conocen más de 700 especies de hongos que afectan a insectos de diferentes órdenes (Devoto, Gerding y France, 2003). Los principales hongos que se ha utilizado son los géneros *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de insectos plaga en la caña de azúcar (Maldonado *et al.*, 2005). El control de curculiónidos, adultos de la especie *Cosmopolites sordidus* obtuvo mortalidades de 85 a 95 % en condiciones de laboratorio tras la aplicación de *Beauveria* (Alves, 1998). Carballo y

Arias de López (1994) reportaron 36 % de mortalidad de adultos *C. sordidus* y 80 % de *Metamasius hemipterus* demostrando su eficacia patogénica.

4.5.2. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEP's)

Los Nematodos Entomopatógenos (NEPs) son enemigos naturales habitantes del suelo que se caracterizan por parasitar artrópodos, principalmente insectos en estado inmaduro (López-Llano y Soto-Giraldo 2016). Los NEP's son organismos parásitos letales y obligados de insectos, presentan una distribución mundial y se utilizan principalmente como agentes de control biológico de plagas del suelo. Los NEP's presentan una relación simbiótica con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, las cuales requieren de este hospedero para tener protección y lograr diseminarse de un insecto a otro. Las familias más importantes y más estudiadas son Steinernematidae quienes se asocian con bacterias del género *Xenorhabdus* y la familia *Heterorhabditidae* que establecen su relación con bacterias del género *Photorhabdus* (Liu *et ál.* 2000; Boemare, 2002; Stock y Goodrich 2008; Vashisth *et ál.* 2013).

4.5.2.1. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de los nematodos entomopatógenos consta de huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto (Fig.6). El juvenil del tercer estadio es de vía libre también llamado dauer o juvenil infectivo (JI), siendo responsable de la localización e infección de los hospederos, éste conserva la cutícula del segundo estadio (J2) y transporta una bacteria simbiote en el tracto digestivo. El estadio juvenil infectivo JI no se alimenta ya que esta morfológica y fisiológicamente adaptado para la dispersión, puede permanecer en el suelo por tiempo prolongado hasta que encuentre un insecto hospedero ya que están adaptados para sobrevivir por largos periodos en el suelo cubierto por la cutícula del segundo estadio, lo cual protege los nematodos de la desecación y otro tipo de estrés ambiental (Campbell y Gaugler, 1991).

El desempeño de los NEP's (*Heterorhabditis*) empieza cuando son atraídos por los gradientes de temperatura y dióxido de carbono que emiten los insectos hospederos, entonces procede a ingresar por las aberturas naturales como boca, ano, espiráculos o atraviesa las membranas intersegmentales a través del diente que le permite romper la cutícula externa del insecto, ingresar y alojarse en el hemocele (Kaya and Stock 1997; Koppenhöfer, 2007; Poinar, 1990; Susurluk, Sahayaraj y Borgio 2011; Vázquez y Álvarez 2011).

La reproducción del nematodo continua hasta que la reserva de alimento del hospedero proporciona lo suficiente para continuar con un nuevo ciclo (tres generaciones). Una vez que la reserva alimenticia no es suficiente el JI adquiere la bacteria simbiote alimentándose de los tejidos licuados del insecto, para posteriormente abandonarlo en busca de otro hospedero (Stock, 2015).

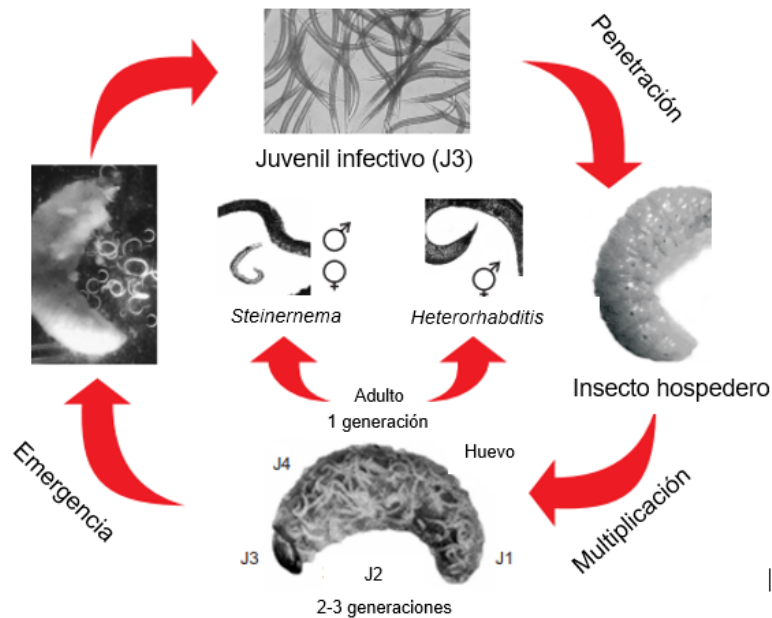


Figura 6. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (Fuente: Dolinski, 2006).

4.5.2.2. BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS

Ambos géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* transportan la bacteria simbiote en su tracto digestivo, siendo *Phoctorhabdus* y *Xenorhabdus*, respectivamente, las cuales una vez que este ingresa al insecto huésped por sus aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) regurgita la bacteria (*Heterorhabditis*) en el hemocele del insecto el cual muere por septicemia, en un intervalo de 24-48 horas, así mismo la bacteria produce antibióticos que evitan el crecimiento de otro tipo de bacterias dentro del insecto y preserva los tejidos semi-descompuestos los cuales el nematodo lo utiliza como alimento (Carballo *et al.* 2004). En el caso de que los nutrientes se acaben, el ciclo de vida termina en el estado JI, que incorpora las bacterias y emigra del cadáver buscando nuevos insectos hospederos (Soler *et al.*, 2003).

Las bacterias simbiotas poseen una forma bacilar y son Gram negativa con anaerobiosis facultativas, no tienen estadios resistentes ni se encuentran en la naturaleza de forma libre, estas bacterias son incapaces de sobrevivir en el suelo por lo que requiere de la protección del JI, ya que su función es inhibir las defensas antibacterianas del hospedero, además en el caso particular de *Photorhabdus* presenta bioluminiscencia (Fig.7) (Poinar *et al.*, 1980).

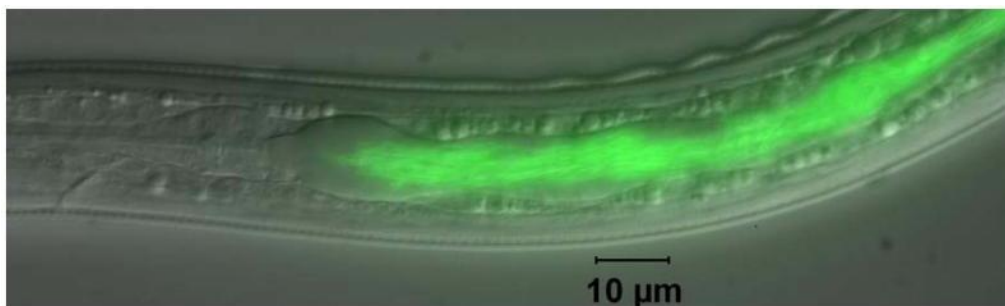


Figura 7. *Photorhabdus luminescens* colonizando el intestino del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*. Imagen tomada de:

(Fuente: <http://riaa.uaem.mx/bitstream/handle/20.500.12055/550/CUPKRR04T.pdf?sequence=1>)

4.5.3. CONTROL DE PICUDOS CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Existen diferentes investigaciones en las que se ha utilizado los NEP's contra picudos, por ejemplo, en Costa Rica, se evaluó la susceptibilidad de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae) (picudo del banano) con el nematodo *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07. Las larvas inoculadas con este aislamiento presentaron mortalidad del 88 % al segundo día y 100 % al tercer día de inoculación. Los resultados indicaron que la cepa *H. atacamensis* CIA-NE07 es capaz de localizar e infectar larvas de picudo dentro del corno de banano y alcanzar porcentajes de infección superiores al 80 %, a 10 días de la inoculación en dosis de 1000 y 2000 JI larva-1 (M. Amador, 2015).

En la localidad de Táchira, Venezuela, se evaluó una cepa del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre el picudo de la piña (*Metamasius dimidiatipennis* Champion (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio, encontrando que los NEP's (cepas 044, 037, 075, SCALL y HP88), necesitaron menos de 3.5 días para lograr el 95 % de mortalidad del insecto con una dosis de 1000 JI/picudo adulto (García-Caicedo, 2013).

En África, una de las principales plagas que afectan las palmeras es el picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver), (Coleoptera: Curculionidae) en los cuales se realizó control biológico con NEP's (*Steinernema carpocapsae*), concluyendo que es una herramienta eficaz para el control de la plaga con un 95 % de mortalidad con una dosis de 2,654 JI/picudo adulto en 3.5 días (Dembilio, 2011).

Mientras que para México, el picudo del agave, *Sphenophorus interstitialis* Gyllenhal, (Coleóptera: Curculionidae) considerado como la principal plaga el agave pulquero (*Agave atrovirens* Kart), agave tequilero (*A. tequilaza* Weber) y agave mezcalero (*A. angustifolia* Haw), Jalisco se han obtenido los mayores porcentajes de control en larvas de tercer estadio y adultos manejado con NEP (*Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora*) teniendo una efectividad del 100 % a los 12 días con una cantidad de 4,000 JI de *Heterorhabditis bacteriophora* /larva y 9,000 JI de *Steinernema feltiae*/larva (Aquino *et al.*, 2006).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. RECOLECTA DE INSECTOS ADULTOS *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal

Para la captura de picudo *S. incurrens* se colocaron trampas, metodología proporcionada e implementada por el Ingenio de Atencingo, Puebla, México. Esta metodología constó de la colocación de 250 trampas las cuales fueron dispuestas en una parcela con una superficie de 1 -ha., en donde se han obtenido reportes de daños por esta plaga (Fig. 8) a través del apoyo y comunicación personal del Ing. Vicente Abeldaño y el Ing. Juan Carlos Anguiano Medina encargados de campos del Ingenio Melchor Ocampo S.A. de C.V. de Autlán de Navarro, Jalisco.



Figura 8. Parcela de caña de azúcar perteneciente al municipio de El Grullo, Jalisco, con presencia de daños de *S. incurrens* Gillenhal.

Como cebo atrayente para el picudo de la caña se utilizó caña molida y melaza diluida en agua al 20 % (5:1), la cual previamente se dejó fermentar 24 hrs., una vez concluido este proceso se agregó piña picada para incrementar su efectividad fagoestimulante o de atracción (Fig. 9).



Figura 9. Preparación de trampas para el picudo, el cual consiste en A, moler las cañas de azúcar en un molino. B, mezclar la caña molida (50 Kg) + melaza (10 L) diluyendo en agua (30 L) en un recipiente de plástico.

Dentro del cultivo se colocaron 250 trampas por hectárea en el cultivo en el suelo y cercas de las cepas de la caña de azúcar ya que los picudos son insectos rastreros, no trepadores los cuales solo salen a la superficie para su apareamiento (Fig. 10).

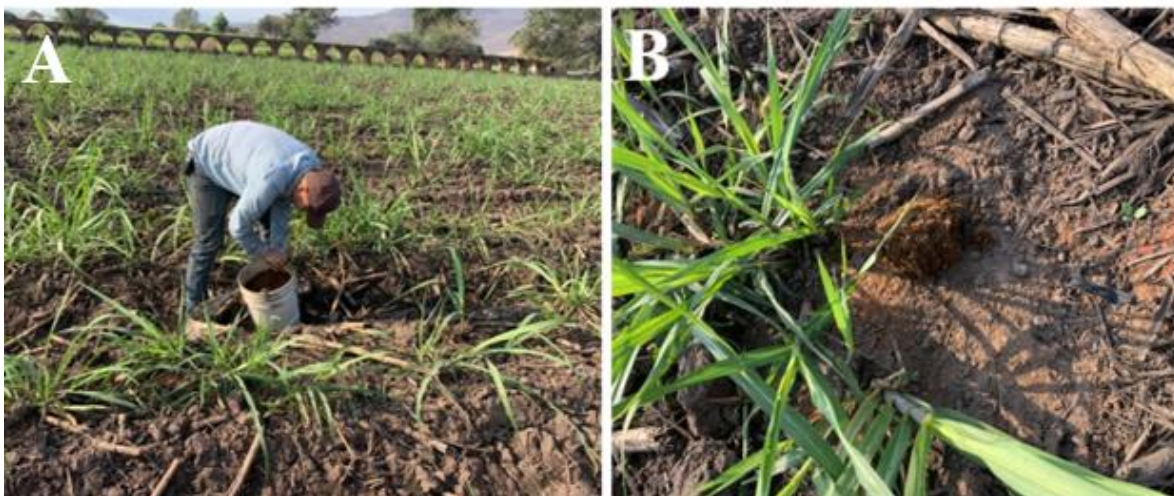


Figura 10. Colocación de trampas como atrayentes de *Sphenophorus incurrens* en parcela de caña. A, colocación de trampas atrayentes para picudo cada 10 m entre trampa y trampa cada tercer surco de caña. B, colocación de trampa para picudo a nivel de suelo junto a la cepa.

Después de 24hrs. de haber colocado las trampas estas son revisadas, la cual consta en remover las trampas y colocarlas sobre un costal blanco extendido en el suelo, donde se procede a revisar detalladamente para recolectar los adultos del picudo de la caña que pudieran ser encontrados (Fig. 11). Una vez colectados los adultos estos fueron guardados en frascos herméticos (capacidad 250 ml, con presencia de agujeros pequeños en la tapa para permitir su oxigenación de los insectos). Posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Biotecnología del Centro Universitario de la Costa Sur de la Universidad de Guadalajara en donde se colocaron en un recipiente de plástico con de 15 litros (cubeta de plástico), para brindarles mayor espacio y minimizar su estrés, colocando en su interior trozos y caña molida como alimento antes de realizar los experimentos.



Figura 11. Exploración y recolecta de picudos en campo, colocando los cebos sobre costales de nylon para la búsqueda de adultos.

6. EXPERIMENTO 1

6.1. BIOENSAYOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Los experimentos se realizaron en los meses de febrero a junio del 2022 en el laboratorio de Biotecnología en el edificio de Posgrado del Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) de la Universidad de Guadalajara, en Autlán de Navarro, Jalisco, México, (Fig. 12). (Latitud: 19° 34' N Longitud: 104° 07' O, Altitud: 920 msnm). Para poder realizar la cuantificación de la patogenicidad de las tres cepas de NEP's y determinar la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) sobre el picudo de la caña de azúcar *S. incurrens*.



Figura 12. A, Edificio de Posgrado del Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR). B, entrada Laboratorio de Biotecnología.

6.1.1. Aislamiento de nematodos entomopatógenos

Para este experimento, se evaluaron tres cepas de nematodos entomopatógenos nativos, estos aislados fueron extraídos por el Dr. Pedro Fabián Grifaldo Alcántara del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) de la Universidad de Guadalajara : *Heterorhabditis* sp. Rancho el Casco, área de ganado bovino, municipio de la Huerta, Jalisco, ubicado geográficamente entre las coordenadas latitud: 19° 20' 30" y 19° 45' 50" N y

longitud: 104° 31' 50" y 105° 13' 20" O, *Heterorhabditis* sp. El Mentidero, extraído del cultivo de pepino en la localidad de El Mentidero (Telesecundaria Venustiano Carranza) y *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19), del cultivo de la caña de azúcar localidad del Mentidero ubicada entre las coordenadas latitud: 19°46'15.919" N y longitud: 104°17'35.257" O, municipio de Autlán de Navarro, Jalisco, México.

6.1.2. Multiplicación de nematodos entomopatógenos

Para su reproducción y multiplicación, se infectaron larvas del tercer y cuarto instar de *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). Estas larvas fueron previamente criadas y establecidas a base de una dieta de salvado, polen, miel, levadura y cera de abejas en laboratorio de biotecnología del Centro Universitario de la Costa Sur (Fig.13).

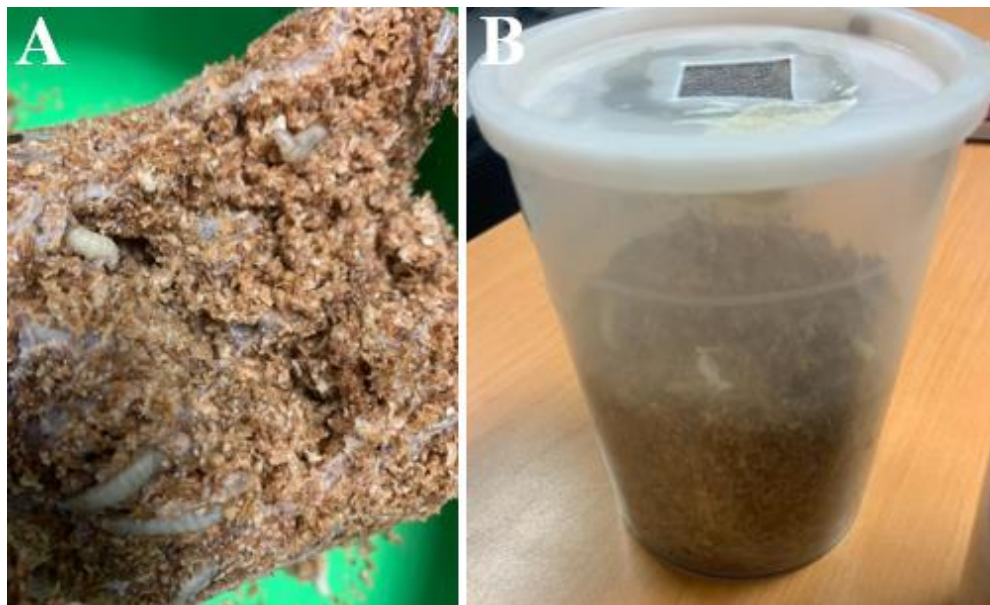


Figura 13. Larvas de *Galleria mellonella*; A, dieta y larvas de *G. mellonella*. B, Frasco de plástico para crecimiento y desarrollo de *G. mellonella*.

Su reproducción constó de la colocación de círculos de papel filtro Whatman # 1 en el interior de cajas Petri de plástico (60 mm), una vez colocados en las bases de las cajas, se agregó 1.5 ml de agua para humedecerlos y posteriormente se agregaron los juveniles infectivos (100 JI por cada larva colocada), e inmediatamente fueron colocadas cuatro larvas del último instar de *G. mellonella* (Fig.14) (Stock y Goodrich-Blair, 2012) y las cajas fueron selladas con su tapa.



Figura 14. Reproducción de nematodos entomopatógenos *in vivo* sobre en larvas de *Galleria mellonella* en condiciones de laboratorio.

6.1.3. Cosecha de nematodos

Transcurridos 11 días después de la infección de los tres aislamientos de nematodos entomopatógenos a las larvas de *G. mellonella*, se llevó a cabo la recuperación o cosecha de los nematodos utilizando trampas White (White,1927). Estas constaban de cajas Petri de vidrio (100 x15 mm) y en su interior una placa de vidrio de reloj 60 x15 mm en el interior, así como en la parte superior de este vidrio un disco de papel filtro (Whatman # 1). Sobre el papel filtro se colocaron los cadáveres de las larvas de *G. mellonella* que presentaron la sintomatología de infección (café oscuro-rojizo), se cierra la caja Petri y se introduce en una bolsa de plástico para la conservación de la humedad. Después de un par de días los juveniles infectivos tienden a orientarse hacia los lugares con mayor humedad por tanto los que emergen de la trampa White se asientan en el agua destilada estéril (Fig.15).



Figura 15. *Galleria mellonella* en Trampa White para la cosecha y obtención de juveniles infectivos (JI) para la realización de los bioensayos.

6.1.4. Almacenamiento y conservación de los NEP's

Una vez obtenido los juveniles infectivos de cada aislamiento, estos fueron almacenados a una concentración de 10 ml (100 JI por cada 1ml) y una temperatura de 6 ± 2 °C, colocándose dentro de frascos de cultivo de tejidos de 20 ml de capacidad (Fig.16).



Figura 16. Conservación de NEP's a temperatura de 6 ± 2 °C para su conservación y preservación a corto plazo en el laboratorio de Biotecnología.

6.1.5. Experimento 1. Concentración letal media (CL₅₀) y tiempo letal medio (TL₅₀).

Para la realización del bioensayo de laboratorio se utilizaron placas para cultivo celular de poliestireno – estéril 12 pozos (Fig.17); los tratamientos constaron de un (control = cero nematodos / agua), 10, 50, 100, 200, 500, 1000 y 5000 JI, con tres repeticiones por cada tratamiento y por cada aislamiento de nematodos utilizando (*Heterorhabditis* sp. El Mentidero, *Heterorhabditis* sp., El Casco y *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19). En las placas de cultivo de tejido se colocó el fondo de cada una de las cavidades dos círculos de papel filtro Watmann #1 esto para retener la humedad y los nematodos pudieran desplazarse. La dosificación de nematodos se realizó a través de una contabilización volumétrica de acuerdo con la metodología propuesta por Stock y Goodrich-Blair (2012).

Donde:

$$S = \frac{N * 1 (X + 1)}{M}$$

N: es el promedio de nematodos por gota

M: es el número de mililitros de la gota

X + 1: es la dilución realizada

S: es la concentración (NEP's /ml) de la solución madre.



Figura 17. Bioensayos en placa de tejido de 12 cavidades, mostrando el papel filtro, los adultos del picudo de la caña y el alimento para minimizar el estrés.

Por último, para cada uno de los tratamientos las cajas de los bioensayos introdujeron en una bolsa de plástico y se envolvieron cerrándolas con cinta papel, esto con la finalidad de evitar la pérdida de humedad dentro las cavidades y así mismo evitar que los picudos lograran escapar (Fig.18). Las cajas fueron mantenidas a una temperatura de 25 ± 2 °C y 12 h luz, 12 h oscuridad. Las evaluaciones fueron cada 24 h. por 10 días, después de haber iniciado las infecciones de los picudos adultos.



Figura 18. Placas de cultivo de tejidos para cada tratamiento de NEP's, colocados en bolsas de plástico y cerrados cinta papel para que no halla perdida de humedad.

6.1.6. Evaluación de mortalidad

Para evaluar las mortalidades de los picudos adultos se utilizaron unas pinzas entomológicas para manipular los insectos y corroborar así la mortalidad de cada uno de ellos (falta de movimiento y rigidez en el cuerpo). Los picudos muertos se colocaron en nuevas cajas Petri (100 x 15 mm), colocando en el fondo un círculo de papel filtro Watmann # 1, 1.5 ml de agua esterilizada, para esperar la emergencia de NEP's y así asegurar que la muerte de los adultos del picudo de la caña haya sido por los tratamientos utilizados.

6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para calcular la concentración letal media (CL₅₀) y tiempo letal medio (TL₅₀) se utilizó el modelo de regresión Probit, esta transformación asume que la relación dosis respuesta corresponde a una

curva sigmoidea o bien una expresión lineal que refleja una función de distribución normal acumulativa de acuerdo a Finney Stevens (1948). Utilizando el programa estadístico SAS.

6.3. RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la concentración letal media (CL₅₀) y al 95 % IC (Cuadro 1) de los tres aislamientos de NEP's hacia adultos del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens*, se consideran que los tres aislamientos tienen efecto patogénico sobre esta plaga.

Se encontró que el picudo de la caña de azúcar *S. incurrens* es más susceptible al aislado de NEP's *Heterorhabditis* sp. El Casco, obtuvo el mejor resultado de patogenicidad con 2,626 JI/picudo, con un límite inferior de 1,084 JI/picudo y un límite máximo de 1,5288 JI/picudo, con un Valor $P < 0.0001$, seguida de la CL₅₀ de *Heterorhabditis* sp. El Mentidero 69167JI/picudo, con un límite inferior de 7,394 JI/picudo y un límite máximo de 122,675 JI/picudo, con un Valor $P < 0.001$ y la CL₅₀ de *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) 11,558 JI/picudo, con un límite inferior de 3,540 JI/picudo y un límite máximo de 192,990 JI/picudo, con Valor $P < 0.0001$, utilizando el Software SAS.

Cuadro 1. Concentración letal media (CL₅₀) de tres cepas nativas de NEP's

CEPA NEP	CL ₅₀ (JI/picudo)	IC _{DL50} 95 %		Intercepto ± EE	Log10(Dosis) ± EE	Valor P
		Inferior	Superior			
<i>Heterorhabditis</i> sp. El Mentidero	69167	7394	122675	-3.1 ± 0.6	0.63 ± 0.2	< 0.001
<i>Heterorhabditis</i> sp. El Casco	2626	1084	15288	-3.0 ± 0.5	0.87 ± 0.2	< 0.0001
<i>Heterorhabditis</i> <i>bacteriophora</i>	11558	3540	192990	-3.9 ± 0.6	0.96 ± 0.22	< 0.0001

De acuerdo al comportamiento de las líneas estimadas de mortalidad del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens* (Fig. 19) y los valores de límites inferiores y superiores a través de las diferentes concentraciones de JI de nematodos entomopatógenos, demostrando diferencia de patogenicidad y siendo mejor el aislado de *Heterorhabditis* sp. El Casco obteniendo un promedio de mortalidad del 50 % de picudos/2,626 JI, en comparación con los otros dos aislados, donde le sigue el aislado nativo *H. bacteriophora* (JAAN-19) 50%/11,558 JI y finalmente *Heterorhabditis* sp. El Mentidero con una mortalidad de un 50% de picudos/69,167 JI. En los resultados podemos observar el comportamiento de las dosis de las tres aislados nativos de NEP's: *Heterorhabditis* sp. El Casco, *H. bacteriophora* (JAAN-19) y *Heterorhabditis* sp. El Mentidero y como al incrementar las dosis obtenemos una mayor mortalidad del adulto del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens* así lo demuestra la línea estimada de la figura 19 donde su comportamiento va de manera ascendente.

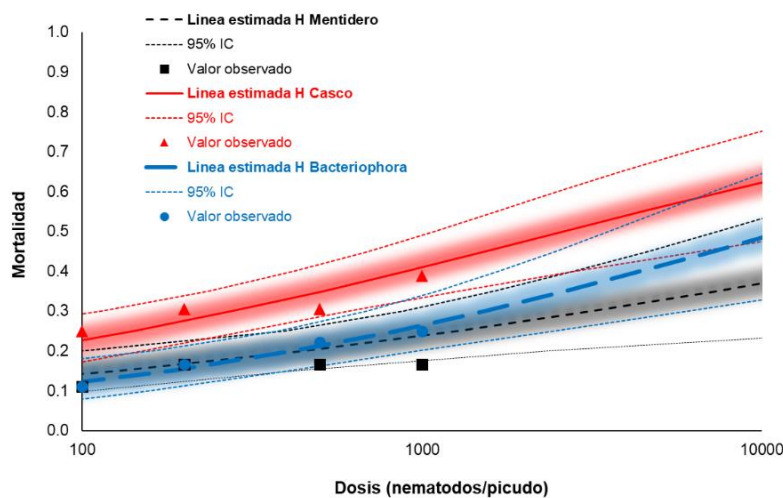


Figura 19. CL₅₀ de tres cepas de NEP's *Heterorhabditis* sp. El Casco, *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) y *Heterorhabditis* sp. El Mentidero; 95% IC.

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre el tiempo letal medio (TL₅₀) (95 % IC) de los tres aislados de NEP's hacia adultos del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens*, a partir del análisis Probit, para cada una de las cepas nativas evaluadas nos muestra que el mejor tiempo letal medio se obtuvo con *Heterorhabditis* sp. El Casco con un TL₅₀ de 17.8 días, un límite inferior de 14.8 días y límite superior de 22.8 días, con un Valor $P < 0.0001$, seguida del aislado de *Heterorhabditis*

sp. El Mentidero con un TL₅₀ de 26 días, un límite inferior de 20.1 días y límite superior de 38.1 días con un Valor $P < 0.0001$ y finalmente el aislado *H. bacteriophora* (JAAN-19) con un TL₅₀ de 28.2 días, un límite inferior de 22.3 días y límite superior de 43 días con un Valor $P < 0.0001$ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tiempo letal medio (TL₅₀) de tres cepas nativas de NEP's

CEPA NEP	TL ₅₀ (días)	IC _{DL50} 95 % (NEP JI)		Intercepto ± EE	Log10(días) ± EE	Valor P
		Inferior	Superior			
<i>Heterorhabditis</i> sp. El Mentidero	26	20.1	38.1	-4.3 ± 0.3	3.0 ± 0.3	<.0001
<i>Heterorhabditis</i> sp. El Casco	17.8	14.8	22.8	-3.2 ± 0.2	2.6 ± 0.2	<.0001
<i>Heterorhabditis</i> <i>bacteriophora</i>	28.2	21.3	43	-4.0 ± 0.2	2.8 ± 0.23	<.0001

En la figura 20 se observa el 95 % IC del comportamiento de las líneas estimadas y el valor observado de mortalidad del picudo adulto de la caña de azúcar *S. incurrens*, a través del tiempo (días), demostrando gran diferencia y siendo mejor el aislado de *Heterorhabditis* sp. El Casco con una mortalidad de *S. incurrens* del 50%/17.8 días, en comparación con los otros dos aislados donde le sigue *H. bacteriophora* (JAAN-19) con una mortalidad del 50% en 26 días y finalmente *Heterorhabditis* sp. El Mentidero que presentó una gran similitud en la mortalidad del 50% en 28.2 días.

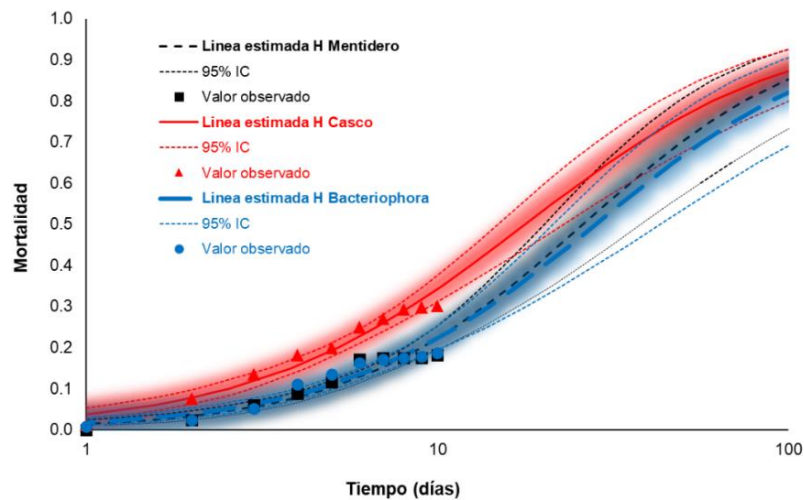


Figura 20. TL_{50} de tres cepas nativas de NEP's *Heterorhabditis* sp. El Casco, *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) y *Heterorhabditis* sp. El Mentidero.

6.4. DISCUSIÓN

La patogenicidad de los aislados de nematodos entomopatógenos evaluados hacía adultos del picudo de la caña *S. incurrens*, fue efectivo para los tres aislados evaluados, sin embargo, el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco presentó mayor patogenicidad sobre esta plaga con una CL_{50} de 2,626 JI/picudo ($P < 0.0001$). Sin embargo, se considera que la efectividad en los tres aislamientos obtuvo variaciones en las cepas evaluadas hacía el hospedero del picudo de la caña; ya que de acuerdo a Rodríguez *et al.* (2009) pese a haber obtenido mortalidades en *G. mellonella* y *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) a través de seis aislados nativos de Heterorhabditidos, únicamente uno de ellos mostró efectividad al matar a seis de 10 larvas de *Phyllophaga elenans* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae) en condiciones de laboratorio, esto debido posiblemente a la co-evolución que han tenido los NEP's y los insectos que interactuaron con ellos en el suelo de donde fueron extraídos, evitando la infección por nematodos a través de la evasión, presencia de espiráculos más compactos o herméticos, sistema inmune, etc. (Gaugler *et al.*, 1994).

Al igual que García-Caicedo *et al.* (2013) tras la finalización de bioensayos en laboratorio, y para corroborar que la muerte haya sido por NEP's colocaron las larvas muertas del picudo de la piña *Metamasius dimidiatipennis* Champeon (Coleoptera: Curculionidae) en trampas White y esperaron la emergencia de JI. En esta investigación también se colocó en trampas de White (1927) a los cadáveres de los adultos del picudo de la caña de azúcar al concluir los ensayos, confirmando que

la muerte de cada uno haya sido realizado por los aislados de NEP's evaluados, teniendo así, a los once días, emergencias de JI en nuevas cajas de cultivos de tejido.

En las evaluaciones realizadas en esta investigación se observó que existe una relación sobre la cantidad de nematodos y el aumento en la mortalidad de la plaga, así como los días que interactúan entre ellos, en donde en primer lugar el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco tuvo un mayor efecto al matar el 50 % de picudos con una dosis de 2,626 JI/picudo y un TL₅₀ de 17.8 días en comparación con el aislado *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) con una dosis de 11558 JI/picudo y un TL₅₀ de 28.2 días y por último el aislado *Heterorhabditis* sp. El Mentidero con una dosis de 69,167 JI/picudo y un TL₅₀ de 26 días. Por otra parte, estudios realizados en Colombia, consideran que en un tiempo de 8 días y a una dosis de 1,000JI, *H. bacteriophora* logró un porcentaje de mortalidad de 79.94 % sobre el picudo del banano *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae) (Jiménez *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque las dosis y los tiempos sean menores en comparación con los resultados obtenidos se infiere en que la patogenicidad puede estar inclinada sobre el tamaño del hospedero, ya que los adultos de *M. hemipterus* poseen un tamaño de 2 cm (Weissling *et al.*, 2003), mientras que los *S. incurrens* posee una longitud de 1.4 cm. Posiblemente, estas diferencias de mortalidades de acuerdo a Bastidas *et al.*, (2014), pudieron deberse al tamaño del insecto huésped, lo cual refuerza Forschler *et al.*, (1990), Treverrow y Bedding (1993), y Sánchez (2002) quienes indican que tras la evaluación de NEP's sobre el picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (1-1.5 cm de largo), una dosis de 1,500 JI en 16 días para lograr el 94 % de mortalidad del insecto, el hospedero presentó resistencia y dificultad a la entrada de los nematodos debido a sus articulaciones muy estrechas y unidas.

Por otra parte, Jiménez *et al.* (2012) argumenta que las mortalidades bajas pueden deberse a la poca movilidad que presentan ciertos hospederos, así como a la facilidad que tienen los JI de entrar por el ano y el aparato bucal, incluyendo una mayor apertura en los espiráculos. Ansari *et al.* (2008) consideran que la efectividad de infección no está dada por las aberturas naturales y el tamaño de cuerpo de los NEP's, sino la interacción que presentan entre el nematodo, la bacteria y el hospedero.

Así, la susceptibilidad de los hospederos puede variar entre las especies o cepas de nematodos que se evalúan y los mecanismos que estos poseen, así después de una infección, las progenies de estos aislados podrán comenzar a tener una mayor mortalidad (Koppenhöfer *et al.*, 2006). Teniendo en

cuenta estos puntos, la susceptibilidad del hospedero bien puede estar dada por la interacción que haya existido en el hospedero, las diversas consideraciones fisiológicas, evasión, adaptación, etc. y así entonces su existencia podría verse reflejada en la efectividad al momento de la infección.

Haciendo una comparación de resultados de García-Caicedo *et al.* (2013) hacía el control del picudo de la piña (*Metamasius dimidiatipennis*) con el nematodo *Heterorhabditis* sp. a una dosis de 9,000 JI, donde logró obtener el 100 % de mortalidad del adulto a los 12 días; consideramos que con los resultados obtenidos en esta investigación podríamos alcanzar una mortalidad de 100 % en cuatro días con el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco si aumentáramos a una dosis de 9,000 JI/picudo.

A pesar de que los aislados evaluados son nativos de tres ecosistemas diferentes su interacción hacía los hospederos y desarrollo del ciclo de vida fue posiblemente muy diferente; por lo tanto, su nicho térmico como lo menciona Molyneux (1986) y naturaleza sobre diferentes hospederos, marcan interacciones físicas y climáticas en cada sitio de hábitat, lo cual bien puede favorecer o perjudicar a uno u otro aislado. Siendo así, el aislado que menor efectividad tuvo fue *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) extraído del cultivo de la caña de azúcar y el que mayor efectividad presentó fue el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco extraído de corrales de ganado bovino; por lo que se esperaría que el NEP's del cultivo de caña de azúcar debería tener mayor efectividad en matar al picudo de la caña por su relación plaga-cultivo.

No obstante, se considera que el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco en su desarrollo de vida pudo haber tenido mayor tipo de interacciones con hospederos del orden Coleóptera que el aislado del cultivo de caña de azúcar *H. bacteriophora* (JAAN-19). Lo cual concuerda con Gaugler and Kaya (1990), quienes indican que los NEP's aislados de diversas regiones geográficas y climáticas al compararlos como agentes de control biológico pueden comportarse de manera diferente.

Por lo tanto, el aislado *H. bacteriophora* (JAAN-19) puede ser efectivo hacía otras plagas, pero su efectividad se reduce al no haber tenido contacto con la plaga del insecto del picudo *S. incurrens*, ya que acuerdo a Beterán (2021) las mayores incidencias de esta plaga fueron encontradas en las localidades de las Paredes y Ayuquila, y no en los alrededores de Autlán de Navarro, lugar de cultivos de caña de donde se extrajo el aislado.

Se sugiere que la efectividad del aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco pudo deberse a la interacción con especies de adultos o estados inmaduros de coleópteros como lo son: fitófagos del complejo

de la gallina ciega de los géneros (*Phyllophaga*, *Anomala* y *Ciclocephala*) o coprófagos (*Onthophagus landolti*, *Canthon indigaceus chevrolati*, *Digitonthophagus gazella*, *C. leechi* y *Pseudocanthon perplexus*) que participan activamente en el reciclaje de nutrientes en el suelo, incorporando la materia orgánica en descomposición o de desecho producida por animales vertebrados (Halfpiter y Edmonds, 1982).

Sin embargo, se consideran todos los aislados evaluados como prometedores para el control del picudo de la caña, ya que se sabe que los *Heterorhabditis* presentan una gran ventaja al presentar estrategia de forrajeo tipo “crucero” y no “emboscador” (*Steinernemidos*), lo que tras su incorporación constante podría generar mayor porcentaje de mortalidad en el hospedero, ya que estos NEP’s presentan quimiorreceptores que les ayudan a orientarse hacia sus hospederos a través de volátiles como el CO₂, ácido láctico y heces del insecto (Kaya y Gaugler, 1993); sumando a lo mencionado por Steiner (1996) el cual menciona que todos los JI tienen la capacidad de buscar y encontrar a su hospedero y de comportarse de una manera diferencial, lo cual puede favorecer a estas cepas evaluadas de NEP’s, al ejercer un control positivo en condiciones de campo llegar a propiciar altas mortalidades de la plaga del picudo *S. incurrens*.

En 2012, Delgado-Ochica y Sáenz-Aponte con la utilización de NEP’s del género *Heterorhabditis* sp. SL0708 contra larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* reportan mortalidades de 85 % con 200 JI/larva del picudo en tres días, lo que nos demuestra que la utilización de NEP’s como controladores biológicos de larvas en campo podría llegar a ser efectiva; considerando que a futuro con el aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco se podría llegar a controlar en condiciones de campo a estadios larvarios y adultos de *S. incurrens* en el cultivo de la caña de azúcar. Tomando en cuenta que las larvas del picudo de la caña, serían mucho más susceptibles a la infección por NEP’s, ya que presentan una cutícula más suave, su movimiento sería mucho más limitado, así como el presentar boca, ano y espiráculos expuestos (Jiménez *et al.*, 2012).

La aplicación de NEP’s para el control de larvas o adultos del picudo de la caña en condiciones de campo se considera podría llegar a tener resultados prometedores, ya que estas larvas poseen hábitos de formación de galerías dentro del tallo, comportamiento que les ha favorecido a la supervivencia y que tras aplicaciones de químicos no ha causado reducciones en su población (Cerdeña *et al.*, 1999). Por ello, el uso de NEP’s sería una excelente opción de manejo para esta plaga, considerando que de acuerdo a Sánchez-Saavedra *et al.* (2012) tras la aplicación de *H. indica* para

el control de larvas del picudo del aguacate en ramas logró obtener un 100 % de mortalidad en 44 horas colocando 250 JI/ml, logrando penetrar dentro de las galerías y causar la infección. Resultados similares podríamos obtener si en un futuro se podrían considerar estrategias en campo para el control larvario de *S. incurrens* en el cultivo de la caña de azúcar a través de NEP's y particularmente de *Heterorhabditis* sp. El Casco debido a su alta capacidad de búsqueda. Por lo tanto, estos NEP's poseen una capacidad de desplazamiento vertical en 10 cm de profundidad en el suelo, distancia promedio en la que se podrían encontrar las larvas, siendo así hospedero susceptible para estos nematodos (tipo "emboscadores") que buscan su recurso alimenticio y de propagación en insectos sedentarios y crípticos (Lewis, 2002).

Por lo tanto, como lo menciona Delgado-Ochica y Sáenz-Aponte (2012) al evaluar seis aislados de NEP's contra el picudo de la guayaba, y obtener como candidato a *Heterorhabditis* sp. SL0708 para ser evaluado a futuro en campo debido a su capacidad de búsqueda del hospedero, alta mortalidad hacía la plaga y permanencia. Consideramos que el asilado *Heterorhabditis* sp. El Casco tendrían las similares características para su efectividad en el control del picudo de la caña de azúcar.

6.5. CONCLUSIÓN

Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) para tres cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP's) *Heterorhabditis* spp. El Casco, *Heterorhabditis bacteriophora* (JAAN-19) y *Heterorhabditis* sp. El Mentidero sobre el picudo adulto de la caña de azúcar *S. incurrens*, de las cuales las tres cepas presentaron eficacia patogénica; estableciendo que el mejor aislado nativo es *Heterorhabditis* sp. El Casco con una CL₅₀ de 2,626 JI/picudo y un TL₅₀ de 17.8 días seguida del aislado *H. bacteriophora* (JAAN-19) con una CL₅₀ 11558JI/picudo y un TL₅₀ de 28.2 días y finalmente el aislado *Heterorhabditis* sp. El Mentidero con una CL₅₀ de 69167JI/picudo y un TL₅₀ de 26 días.

El aislado *Heterorhabditis* sp. El Casco se presenta como la mejor alternativa de control biológico con el uso de NEP's para el control del picudo adulto de la caña de azúcar *S. incurrens*.

Con esta investigación se demostró la existencia de nuevos aislados nativos de NEP's que tienen potencial de patogenicidad contra el adulto del picudo de la caña de azúcar *S. incurrens* en México.

7. LITERATURA CITADA

- Alekseev, E., Glazer, I., and Samish, M. 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. *Biocontrol*. 51(4): 507–518.
- Alpizar, D., Fallas, M., Oehlschlager, A., Gonzalez, L., Chinchilla, C. and Bulgarelli, J. 2002. Pheromone mass trapping of the west Indian sugarcane weevil and the american palm weevil (Coleoptera: Curculionidae) in palmito palm. *Florida Entomologist* 85(3): 426–430.
- Alves, S. B. 1998. Fungos entomopatogénicos. In. *Controle microbiano de insectos*. 2da. Ed. Piracicaba, Brasil, FEALQ. pp 289–381.
- Amador, M., Molina, D., Guillen, C., Parajeles, E., Jiménez, K., y Uribe, L. 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense* 39(3): 47–60.
- Amaya, A., Cock, J., Hernández, A. del P., & Irvine, J. 1995. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. In CENICANA (Ed.), *Centro De Investigación De La Caña De Azúcar De Colombia* (Primera, pp. 31–63). Colombia, Cali.
- Ansari, M.A., ALI, F., and Moens, M. 2006. Compared virulence of the Belgian isolate of *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and the type population of *S. scarabaei* to white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Nematology* 30: 787–791.
- Aquino, B., T., J. Ruiz V. y M., Iparraguirre C. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nematodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Rev. UDO Agrícola* 6(1): 92– 101.
- Arredondo, B., H. C. y Rodríguez del B., L. A. 2008. Casos de control biológico en México. *Mundi Prensa México*. México, D. F., México. 423 p.

- Atlahua-Lezama, I., Yáñez-Morales, M. de J., Alatorre-Rosas, R. y Hernández-Rosas, F. 2015. Muermo rojo, *Colletotrichum falcatum* asociado a la mosca pinta en caña en Veracruz. XXXVII Convención Nacional ATAM, WTC Boca del Río Veracruz, Memorias.
- Ávila, I. 2011. El Aguardiente de caña, procesos y tradición en el Valle de Yunguilla. Universidad de Cuenca.
- Badilla, F. 1997. Plagas de importancia económica de la caña de azúcar en Latinoamérica y principales estrategias de control. In Congreso Costarricense de Entomología; 4, San José, Costa Rica. Resúmenes, p. 77–79.
- Bahena, J. F. 2008. Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos. Texcoco Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 21–27.
- Barbercheck, M. 1992. Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insects pest. Florida Entomologist, 75: 539–548.
- Barreto-Triana, N., Dos Santos-Días, C. T., y Mauricio-Bento, J. 2014. reproductivo de la caña, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. Revista Colombiana de Entomología, 40:265–271.
- Beterán, H. 2021. Registro y dinámica poblacional del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal (Coleóptera: curculionide). Biblioteca Digital wdg.biblio Universidad de Guadalajara.
- Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, pp. 35–56. In: R. Gaugler (ed.). Entomopathogenic nematology. CABI.
- Burgos, J. 2015. Estudio de la lámina óptima de riego para el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en la parroquia San Carlos del cantón Naranjal - provincia del Guayas (Vol. 31). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i0.530>.
- Burnell, A. and Stock, S. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. Nematology 2(1): 31–42.
- Cajusol M. & Requejo L., 2016. Conservación de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa) en tres sustratos a diferentes tiempos y

temperaturas de almacenamiento, en laboratorio. Junio 2015 – enero 2016. Lambayeque – Perú. [Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo].

Campbell, L. R. y Gaugler, R. 1991. Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *International Journal Parasitology*. 21: 219–224.

Carballo, V. y Arias de López, M. 1994. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control de *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de campo. CATIE, Costa Rica, *Revista MIPE*, 31: 22–24.

Castiñeiras, A., López, M., Calderón, A., Cabrera, T., y Luján, M. 1990. Virulencia de 17 aislamientos de *Beauveria bassiana* y 11 de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Cosmopolites sordidus*. *Ciencias y Técnicas en la Agricultura (Cuba)* 13(3): 45–51.

Ceballos, G. J., Arroyo-cabral, R. A., Medellín y Domínguez-Castellanos, Y. 2005. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 9: 21–71.

Cerda, H., Fernández, G., López, A. and Vargas, J. 1999. Olfactory attraction of the sugarcane weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant odors, and its aggregation pheromone. *Florida Entomologist* 82: 103–112.

Chastel, J. M. 1994. Le sucre et ses marchés, *Agriculture et développement*, 4: 4–11.

Colares, F., Michaud, J. P., Bain, C. L. and J. B. Torres. 2015. Recruitment of aphidophagous arthropods to sorghum plants infested with *Melanaphis sacchari* and *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae). *Biological Control*, 90: 16–24.

CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo sustentable de la Caña de Azúcar). 2022. Ficha técnica del cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Gobierno de México, MEX. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/141823/Ficha_Tecnica_Ca_a_de_Az_car.pdf (consultado 15 jul. 2022).

Dávila, D. A. 2014. Evaluación de dos sistemas de siembra en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) para la obtención de semilla en la provincia del Cañar – cantón La Troncal. *Implementation Science*, 39(1): 1–15. <https://doi.org/10.4324/9781315853178>.

- De la Cruz-Llanas, J. J., J. Vera-Granizo, J. Lopez-Collado, V. M. Pinto, y R. Garza-García. 2005. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopiade). *Fol. Entomol. Mex.* 44(1): 91–93.
- Delgado-Ochica, Y., y Sáenz Aponte, A. 2012. Virulencia, producción y desplazamiento de nematodos entomopatógenos sobre larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. *Universitas Scientiarum*, 17(3): 283–290.
- Dender, J. 2018. Evaluación de trampas con atrayentes para el control del picudo rayado en el cultivo de caña de azúcar. Manta, Ecuador.
- Devoto, L., Gerding, M., y France, A. 2003. Hongos entomopatógenos: Una alternativa para la obtención de biopesticidas. Informativo Agropecuario, Bioleche – Inia Quilamapu. <http://www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/boletin23.html>.
- Esaú, E. 2019. Evaluación del daño causado por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), en el cultivo orgánico de *Saccharum officinarum* Var. Canal Point 57603, en el municipio de San Agustín-Huila. Disponible en: 33 <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/40408/eerealpe.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Estrada, D. A., M. I Quiñones, D. M. Sierra, D. A. Calle, F. R., H. F, Erazo y Y. M. Linton. 2003. Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Gabaldon, *Anopheles oswaldoi* (Peryassu) y *Anopheles rangeli* Gabaldon. *Biomedica*. 23(4): 388–395.
- Fernández, M., y A. Ramos. 1986. Biología de *Prosapia (Monecphora) bicincta* fraterna (Homoptera: Cercopiade) en caña de azúcar y pasto. *Revista de Protección Vegetal (Cuba)* 1: 34–50.
- Finney, D.J. y Stevens W.L. 1948. "Una tabla para el cálculo de probits de trabajo y pesos en el análisis probit" *Biometrika* 35 (1-2): 191–201.
- Flores C.S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. Ed. Trillas. México 350 p.

- Forschler, B.T., All J. N., Gardner W.A. 1990. *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. *Journal of Invertebrate Pathology* 55(3): 375–379.
- García-Caicedo, María, Torres, Ángel, & Ochoa, Ángel. 2013. Evaluación de nematodos entomopatógenos para el control del picudo de la piña en el estado Táchira Venezuela. *Agronomía Tropical*, 63(1-2): 5–14.
- Girón-Pérez, K., Nakano, O., Silva, A. C., and Oda-Souza, M. 2009. Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. *Neotropical Entomology* 38(6): 842–846.
- Gómez, L.A. 1995. Manipulación y aumento de enemigos naturales en el MIP. *Bases Tecnológicas del MIP*, p. 93–100.
- González, C., Aristizábal M, y Aristizábal J.C. 2007. Dinámica poblacional de picudos en plátano (Musa AAB) Dominico Hartón. *Revista Agronomía*, 15(2): 33–38.
- Griffin, C. T., Boemare, N. E. and Lewis, E. E. 2005. Biology and behaviour. In: Grewal, P.S., Ehlers, R-U. & Shapiro-Ilan, D.I. (Eds) *Nematodes as Biocontrol Agents*. 47–64. CABI Publishing, Croydon, U.K.
- Halffter, G. and W. D. Edmonds. 1982. The nesting behavior of dung beetles (Scarabaeinae). An ecological and evolutive approach. Instituto de Ecología/ MAB-UNESCO, México, D.F. p. 176
- Helfgott, S. 2016. El Cultivo de la Caña de Azúcar en la Costa Peruana. UNALM. Lima, Perú. pp. 127-495.
- Hernández F., L. M., M. A. Urías L., J. I. López A., y J. G. López A. 2012. Uso de atrayentes y suplementos alimenticios para el incremento de depredadores de escama blanca del mango, *Aulacaspis tubercularis* Newstead (Hemiptera: Dispididae). *Acta Zoológica Mexicana*. 28(1): 145–160.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2020. Ubicación geográfica <https://www.inegi.gob.mx/es/jalisco/municipios/autlán-de-navarro>.

- Jiménez, C. A.; Vargas, T. W. V.; Salinas C., E.; Aguirre B., M. y Rodríguez C., D. 2004. Aptitud agroecológica para el cultivo de la caña de azúcar en el sur de Tamaulipas. México Investigaciones Geográficas. Boletín del Instituto de Geografía, Vol. 53, p. 58–74.
- Jiménez, J. A., López, N. J. A. y Soto, G. A. 2012. Patogenicidad de dos nematodos entomopatógenos sobre *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae). Bol. Cient. Mus. Hist. Nat., 16(2): 87–97.
- Joyce, A. L., Sermeno-Chicas, M., Serrano-Cervantes, L., Paniagua, M., Scheffer, S.J. and Solis, MA. 2016. Host-plant associated genetic divergence of two *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) stemborers on novel crop plants. Ecology and Evolution. 6(23): 8632–8644.
- Kaya, H.K., and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38(1): 181–206.
- King, A. B. S., 1994. Biología e identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* en América Central. In: Seminario Centroamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga* spp. Phillip Shannon y Manuel Carballo (Ed). CATIE/PRIAG, Turrialba, Costa Rica. 1994.
- Koppenhöfer, A.M., Grewal P.S., and Fuzy E. M. 2006. Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. Biological Control 38: 397–404.
- Lewis, E. E. 2002. Behavioral ecology. In: Gaugler R. (Ed.). Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. New York, 205–221.
- Lewis, E. E., and Clarke, D. J. 2012. Nematodes Parasites and Entomopathogens. In Kaya, H. K., y Vega, F. E. (Eds.) Insect Pathology (pp. 397–398). Elsevier.
- Liu J., Poinar G.O. and Berry, R. E. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. Annual Review of Entomology 45(1): 287–306.
- López, J. 2015. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela. Caso: Nordeste del Departamento de Antioquia (Vol. 16). <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2013.0625>.

- López-Llano, R.A. & Soto-Giraldo, A., 2016.- Aislamiento de nematodos entomopatógenos nativos en cultivos de caña panelera y pruebas de patogenicidad sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 20(2): 114–123. DOI: 10.17151/bccm.2016.20.2.8.
- López, V.J.J., Valdez, B.A., Silva, R.H.V., Flores, R.C., Rangel, O.C.A. 2016. Evaluación a la escaldadura (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) de la hoja de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad*, 9(3): 48–53.
- Márquez, J. M. 2002. Metodología del muestreo de daño y pérdidas ocasionadas por rata en caña de azúcar. En: Memoria del XIV Congreso de Técnicos Azucareros de Centroamérica (ATACA) Guatemala, ATAGUA. pp. 68–74.
- Montoro, Y., Moreno, R., Gomero, L. y Reyes, M. 2009. Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4): 466–472.
- Nicholls, E.C.I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia 2008; 2–124.
- Pantaleón, P. G. 2012. Termitas subterráneas de la caña de azúcar en México: Monitoreo, identificación, daños y control. Editorial Académica Española.
- Pérez, C., N. 2004. Manejo ecológico de plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. La Habana, Cuba. 292 p.
- Pérez, N. B. De La O., V. López M., D. Jiménez G., and R. W. Jones. 2014. Determination of spatial distribution of *Sphenophorus incurrens* (Coleoptera).
- Rivera, F. 2008. El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en la región de Cardel, centro de Veracruz. Universidad Autónoma Agraria, 55. Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1417/El cultivo de la caña de azúcar \(*Saccharum officinarum* L.\) en la región Cardel, centro de Vracruz.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1417/El%20cultivo%20de%20la%20ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar%20(Saccharum%20officinarum%20L.)%20en%20la%20regi%C3%B3n%20Cardel,%20centro%20de%20Veracruz.pdf?sequence=1).
- Rodríguez, D., Torres, M., Uribe, L. y Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phillophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 171–182.

- Rodríguez, D., Rodríguez, J., Rodríguez, D., Castillo, A., Enríquez, V., Milanés, N., Aguilar, N. y Herrera, A. 2011. Método en la determinación de presencia y daño de barrenadores, caso: Central Progreso, S.A. DE C.V. Veracruz, México. pp. 1.
- Rodríguez-Leyva, E., Lomelí-Flores, J. R., Valdez-Carrasco, J. M., Jones, R. W. y Stansly, P.A. 2012. New records and locations of parasitoids of the pepper weevil in México. *Southwestern Entomologist*. 37(1): 73–83. <https://doi.org/10.3958/059.037.0109>.
- Rosales, L., Rodríguez, M., Enrique, R., Puente, L., y García, J. 2009. Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de insectos plaga, 19– 22.
- Sáenz, C., D. Alfaro, J. D. Salazar, A. Rodríguez, y R. Oviedo. 1999. Evolución histórica del manejo de plagas en el cultivo de la caña de azúcar en Costa Rica. In: XI Congreso Nacional Agronómico / V congreso nacional de Entomología. San José, Costa rica. pp. 147–152.
- Sánchez, L. 2002. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis de doctorado, Universidad Agraria de La Habana, La Habana, Cuba. 100 p.
- Sánchez-Saavedra, Ma. G., Cortez-Madrigal, H. y Ochoa-Estrada, S. 2012. Parasitismo de larvas de *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) por *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología* 38(2): 200–207.
- Saunders, J. L., D. T. Coto, y A. B. S. King. 1998. Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central. 2da. Edición, Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Segura-León, O. L., Romero-Nápoles, J. y Díaz-Corro, L. 2014. El problema actual del picudo del tronco de la caña de azúcar, *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal (Coleoptera: Dryophthoridae) en los estados de Morelos y Michoacán, México. Ponencia ATAM 2014.
- Segura-León, O., Hernández-Arenas, M., Cibrián-Tovar, J. and Romero-Nápoles, J. 2013. Damage diagnostic of *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae: Dryophthorinae), in sugar cane in México. *Entomological Society of America Annual Meetings*.

- Shapiro-Ilan, D., Cottrell, T. E. and Gardner, W. A. 2004. Trunk perimeter applications of *Beauveria bassiana* to suppress adult *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science*. 39(3): 337–349. Doi: doi.org/10.18474/0749-8004- 39.3.337.
- Singh, B.U., Padmaia P.G. and Seetharama N. 2004. Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review. *Crop Protection*, 23: 739–755.
- Soler, D.M., Gómez, L. y Sánchez, L. 2003. Formulación de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 18(1): 9–10.
- Sosa, O., J. M. Shine, and P. Tai. 1997. Indian cane weevil (Coleoptera: Curculionidae): a new pest of sugarcane in Florida. *J. Econ. Entomol.* 90: 634–638.
- Stock, SP y Goodrich-Blair H. 2012. Nematodos parásitos, patógenos y asociados de insectos e invertebrados de importancia económica. En: Lacey LA, editora. *Manual de Técnicas en patología de Invertebrados*. Prensa Elsevier; 375–425.
- Stock, P. 2015. Diversity, biology and evolutionary relationships. En: R. Campos-Herrera (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. New York: Springer. Pp. 3–27.
- Subirós, F. 1995. *El cultivo de la caña de azúcar* (Primera Ed; Editorial Universidad Estatal a Distancia, Ed.). San José, Costa Rica.
- Takhtajan, A. 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Botanical review* 46: 225–359.
- Treverrow, N.L. and Bedding R.A. 1993. Development of a system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* with entomopathogenic nematodes, pp. 41–47. In: R. Bedding, R. Akhurst and H.K. Kaya (eds.). *Nematodes and the biological control of insect pests*. Nematodes and the biological control of pest. Melbourne Australi.
- Vaurie, P. 1951. Revision of the genus *Calendra* (Formerly *Sphenophorus*) in the United States and Mexico (Coleoptera, Curculionidae). *Bulletin of the American of Natural History* 98(2):1–186
- Vaurie, P. 1954. New species of *Calendra* from México, with notes on others (Coleoptera, Curculionidae). *Am. Mus. Novit.* 1681: 1–8.

Weissling, T., Giblin-Davis, R., Center, B., Heath, R. and Peña, J. 2003. Oviposition by *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Dryophthoridae: Rhynchophoridae). Florida Entomologist, 28(2): 174–177.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. Science, 66: 302-303.