

INFECTIVIDAD DE *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) EN ADULTOS Y LARVAS DE GALLINA CIEGA (Coleoptera: Melolonthidae)

María Guadalupe Sánchez-Saavedra¹; Hipólito Cortez-Madrigal^{1*}; David Cristobal-Acevedo²

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Instituto Politécnico Nacional, Justo Sierra Núm. 28, Col. Centro, Jiquilpan, Michoacán. MÉXICO. C. P. 59510. Correo-e: hcortezm@ipn.mx (*Autor para correspondencia).

²Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, MÉXICO. C. P. 56230.

RESUMEN

Para determinar el potencial del nematodo *Heterorhabditis indica* en el manejo del complejo gallina ciega (Col: Melolonthidae), durante 2010 y 2011 se implementaron ensayos con larvas y adultos de la plaga en Jiquilpan, Michoacán, México. Los insectos se colectaron en la región de estudio; los primeros, en maíz, y los segundos, en trampas luminosas, donde predominó el género *Phyllophaga*. Se aplicó una dosis de 2,500 nematodos·ml⁻¹ por individuo y las lecturas de mortalidad iniciaron a las 24 h. Para determinar la mortalidad se empleó un análisis de varianza. El tiempo en que murió el 50 % de la población (TL50) se estimó mediante análisis probit. Mediante larvas de *Galleria mellonella* se estimó la infectividad del nematodo en tres suelos regionales. Adicionalmente, se practicaron pruebas de correlación para conocer la relación entre las características del suelo y la mortalidad. Cinco días después, la mortalidad de larvas de tercer estadio fue del 46 %. Para adultos, el TL50 se estimó en 48.97 h (47.49 – 51.34 h). En ninguno de los adultos muertos por *H. indica* emergieron juveniles infectivos. La textura, el pH y la CE fueron las características de los suelos que más influyeron en la actividad del nematodo. Los resultados muestran que *H. indica* tiene potencial para el manejo de larvas y adultos de *Phyllophaga* spp. Se plantea la técnica de autodeseminación del nematodo mediante adultos de gallina ciega. Sin embargo, primero se requiere identificar la causa que limitó la emergencia de nematodos juveniles de adultos de la plaga.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Phyllophaga* spp., nematodos, mortalidad, larvas, adultos.

INFECTIVITY OF *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) IN ADULTS AND LARVAE OF WHITE GRUB (Coleoptera: Melolonthidae)

ABSTRACT

To determine the potential of the nematode *Heterorhabditis indica* in the management of the white grub complex (Col: Melolonthidae), during 2010 and 2011 bioassays were implemented with larvae and adults of the pest in Jiquilpan, Michoacán, Mexico. The insects were collected in the study region; the first, in corn, and the latter, in light traps, where the genus *Phyllophaga* dominated. A dose of 2,500 nematodes·ml⁻¹ per individual was applied and the mortality readings began at 24 h. To determine mortality, an analysis of variance was employed. The time in which 50 % of the population died (LT50) was estimated by means of probit analysis. The infectivity of the nematode was estimated through larvae of *Galleria mellonella* in three regional soils. In addition, correlation tests were practiced to know the relationship between the soil characteristics and mortality. Five days later, the mortality of third stage larvae was 46 %. For adults, the LT50 was estimated at 48.97 h (47.49 – 51.34 h). No infective juveniles emerged from any of the adults killed by *H. indica*. The texture, pH and EC were the soil characteristics that influenced most in the activity of the nematode. Results show that *H. indica* has potential for the management of larvae and adults of *Phyllophaga* spp. The technique of self-dissemination of the nematode is proposed using adults of white grub. However, first it is necessary to identify the cause that limited the emergence of juvenile nematodes from adults of the pest.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Phyllophaga* spp., nematodes, mortality, larvae, adults.

INTRODUCCIÓN

El complejo de especies conocidos como “gallinas ciegas” (Coleoptera: Melolonthidae) constituyen una de las principales plagas agrícolas de América Latina, debido fundamentalmente a sus hábitos polífagos y amplia distribución (King y Saunders, 1984; Morón, 1997). En México se distribuye desde las regiones tropicales hasta las de clima templado (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez, 2000; Aragón-García *et al.*, 2001; Marín y Bújanos, 2008; Pérez-Agis *et al.*, 2008) y la “Ciénega de Chapala” (Jal-Mich.) es una de las más afectadas por esta plaga (Castañeda, 2009). Los principales daños son ocasionados por las larvas al alimentarse de las raíces de la planta, daño que incluso llega a ocasionar su muerte (King y Saunders, 1984; Morón, 1997). Se han estimado en México pérdidas del 30-40 % de la producción de maíz (Romero-López *et al.*, 2010). Aunque se enfatiza en el manejo integrado del insecto (Coto, 2000; Pardo-Locarno y Montoya, 2007), en la práctica el control de la larva ha sido basado en la aplicación preventiva de insecticidas (King y Saunders, 1984; Ceccon *et al.*, 2004; Castañeda, 2009).

El uso constante de plaguicidas órgano-sintéticos eventualmente ocasiona mayores problemas que los que resuelve. Entre ellos destacan el impacto en organismos no blanco, eliminación de enemigos naturales, resistencia de la plaga, contaminación de suelos y aguas, residuos en alimento e intoxicación en humanos (Pimentel y Edwards, 1982; Seefó, 2005). En plagas como la gallina ciega, en donde los insecticidas son aplicados directamente al suelo, además de ser parte obligada del paquete tecnológico (hasta dos veces por año), es de esperar que los efectos colaterales de los plaguicidas sean aún mayores.

En la actualidad se buscan estrategias de control de plagas más amigables con el ambiente. Entre ellas, el uso de microorganismos como hongos y nematodos son de los más importantes (Lacey *et al.*, 2001; Kaya *et al.*, 2006). Los nematodos entomopatógenos (NE) presentan habilidad para matar insectos rápidamente (24-48 hr) debido a la presencia de bacterias mutualistas en su interior. Sus principales hospederos son insectos del suelo, hábitat natural de los nematodos (Tanada y Kaya, 1993). Diversos estudios documentan la eficacia de esos organismos en el control de plagas rizófagas (McCoy, 2000; Georgis *et al.*, 2006; Campos-Herrera, 2010) y han sido propuestos como herramienta de manejo de larvas de la familia Melolonthidae (Koppenhöfer y Fuzy, 2003; Koppenhöfer *et al.*, 2006). Sin embargo, pocos estudios han sido desarrollados con el género *Phyllophaga* (Rodríguez *et al.*, 2009), uno de los más importantes como plagas agrícolas (King y Saunders, 1984; Morón, 1997).

Aunque poco considerado, el control de adultos puede también reducir las poblaciones de larvas de la siguiente generación. Así, Badilla *et al.* (1999), al coleccionar altas poblaciones de *Phyllophaga* spp. en el cultivo de la caña de azúcar en Costa Rica, redujeron el daño en el cultivo.

INTRODUCTION

The complex of species known as “white grub” (Coleoptera: Melolonthidae) represents one of the principal agricultural pests of Latin America, mainly due to their polyphagous habits and wide distribution (King and Saunders, 1984; Morón, 1997). In Mexico it is distributed from the tropical regions to those of temperate climate (Ramírez-Salinas and Castro-Ramírez, 2000; Aragón-García *et al.*, 2001; Marín and Bújanos, 2008; Pérez-Agis *et al.*, 2008) and the “Ciénega de Chapala” (Jal-Mich.) is one of the areas most affected by this pest (Castañeda, 2009). The principal damages are caused by the larvae as they feed on the roots of the plant, damage which even causes its death (King and Saunders, 1984; Morón, 1997). Losses in Mexico have been estimated at 30-40% of corn production (Romero-López *et al.*, 2010). Although integrated management of the insect has been emphasized (Coto, 2000; Pardo-Locarno and Montoya, 2007), in practice the control of the larva has been based on the preventive application of insecticides (King and Saunders, 1984; Ceccon *et al.*, 2004; Castañeda, 2009).

The constant use of organ-synthetic insecticides eventually causes greater problems than those they solve. Among these problems is the impact on non-target organisms, elimination of natural enemies, resistance of the pest, contamination of soil and water, residues in food and intoxication in humans (Pimentel and Edwards, 1982; Seefó, 2005). In pests such as white grub, where the insecticides are applied directly to the soil, in addition to being an obligatory part of the technological package (up to twice a year), it is to be expected that the collateral effects of the pesticides will be even greater.

Presently, strategies of pest control that are more environment-friendly are being sought. Among them, the use of microorganisms such as fungi and nematodes are the most important (Lacey *et al.*, 2001; Kaya *et al.*, 2006). The entomopathogenic nematodes (EPNs) present the ability to kill insects rapidly (24-48 h) due to the presence of mutualistic bacteria in their interior. Their principal hosts are insects of the soil, natural habitat of the nematodes (Tanada and Kaya, 1993). Diverse studies document the effectiveness of these organisms in the control of rhizophagous pests (McCoy, 2000; Georgis *et al.*, 2006; Campos-Herrera, 2010) and have been proposed as a management tool for larvae of the family Melolonthidae (Koppenhöfer and Fuzy, 2003; Koppenhöfer *et al.*, 2006). However, few studies have been developed with the genus *Phyllophaga* (Rodríguez *et al.*, 2009), one of the most important agricultural pests (King and Saunders, 1984; Morón, 1997).

Although it has not been given much consideration, the control of adults can also reduce larva populations of the following generation. Thus, Badilla *et al.* (1999), by collecting large populations of *Phyllophaga* spp. in the sugar cane crop in Costa Rica, reduced the damage to the crop. Similarly, the damage from larvae to corn in Santa Cruz

De igual manera, el daño por larvas en maíz en Santa Cruz Alpuyec, Puebla, México, fue menor en parcelas donde previamente se colocaron trampas luminosas para la captura de adultos, en comparación donde no se utilizaron las trampas (Aragón-García *et al.*, 2008).

Dado el amplio abanico de hospederos de los NE, éstos pudieran también infectar y matar adultos. Sin embargo, hasta donde se sabe, esos entomopatógenos no han sido evaluados en adultos de la plaga. Estos pudieran aprovecharse como medio de dispersión de los NE en campo para el control de la plaga (larvas y adultos). Estudios al respecto han demostrado factibilidad mediante el cebado de trampas luminosas con hongos entomopatógenos de manera que el adulto pudo diseminar al entomopatógeno (Vázquez, 2000, citado por Pardo-Locarno y Montoya, 2007).

Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar el potencial del nematodo *Heterorhabditis indica* cepa Tab-03 en el manejo de larvas y adultos de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Tanto larvas como adultos de gallina ciega se colectaron del campo; las primeras, durante el mes de octubre del 2010 de zonas productoras de maíz de la región de influencia del CIIDIR-Michoacán. Los adultos se capturaron mediante trampas luminosas colocadas en el terreno experimental del CIIDIR-IPN, en Jiquilpan, Michoacán, México, durante los meses de junio y julio del 2010-2011. Aunque se colectaron diversas especies, se seleccionaron sólo las del género *Phyllophaga* spp., dentro de las que destacó *P. misteca* (Bates). La identificación del género se realizó mediante literatura especializada (Abarca y Quesada, 1997; Morón, 1997; Lugo-García *et al.*, 2011) y de la especie con el apoyo del Dr. Miguel Ángel Morón Ríos, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz.

El nematodo utilizado fue la especie *Heterorhabditis indica* cepa Tab-03, aislada de Tabasco, México en 2003 y conservada en el laboratorio de entomología del CIIDIR-IPN, Jiquilpan, Michoacán. Se multiplicó en larvas de *Galleria mellonella* (Lep: Pyralidae). Los nematodos utilizados fueron de 10 días de emergidos.

Ensayos con larvas

En recipientes de plástico de 5 x 6 cm se agregaron 3 cm de dos tipos de sustrato: suelo y composta (a base de fibra de coco). Inmediatamente se aplicó una dosis de 2,500 nematodos·ml⁻¹ con una viabilidad superior al 95 % y una larva de *Phyllophaga* spp. del tercer estadio fue colocada en su interior. Se establecieron tres repeticiones con diez larvas por repetición y se incluyó un testigo sin nematodos. El ensayo se incubó a 25 ± 1 °C y las lecturas de mortalidad fueron tomadas a partir de las 24 h. A medida

Alpuyec, Puebla, México, was lower in plots where light traps had previously been placed for the capture of adults, compared to where traps had not been used (Aragón-García *et al.*, 2008).

Given the wide range of hosts of the EPNs, they can also infect and kill adults. However, as far as it is known, these entomopathogens have not been evaluated in adults of the pest. They could be used as a means of dispersal of the EPNs in the field to control the pest (larvae and adults). Studies to this respect have demonstrated viability of the use of baited light traps with entomopathogenic fungi in such a way that the adult could disseminate the entomopathogen (Vázquez, 2000, cited by Pardo-Locarno and Montoya, 2007).

Therefore, the objective of the study was to determine the potential of the nematode *Heterorhabditis indica* strain Tab-03 in the management of larvae and adults of white grub (Coleoptera: Melolonthidae).

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Both larvae and adults of white grub were collected from the field; the former, during the month of October of 2010 in corn producing zones of the region of influence of the CIIDIR-Michoacán. The adults were captured with light traps placed in the experimental plot of the CIIDIR-IPN, in Jiquilpan, Michoacán, México, during the months of June and July of 2010-2011. Although diverse species were collected, only those of the genus *Phyllophaga* were selected, among which *P. misteca* (Bates) was outstanding. The identification of the genus was carried out by consulting specialized literature (Abarca and Quesada, 1997; Morón, 1997; Lugo-García *et al.*, 2011), and of the species with the help of Dr. Miguel Ángel Morón Ríos, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz.

The nematode used was the species *Heterorhabditis indica* strain Tab-03, isolated in Tabasco, México in 2003 and conserved in the entomology laboratory of the CIIDIR-IPN, Jiquilpan, Michoacán. It was multiplied in larvae of *Galleria mellonella* (Lep: Pyralidae). The nematodes used were of 10 days emergence.

Assays with larvae

In plastic recipients measuring 5 x 6 cm, 3 cm of two types of substrate were added: soil and compost (based on coconut fiber). Immediately a dose of 2,500 nematodes ml⁻¹ was applied with a viability of over 95 % and a third stage larva of *Phyllophaga* spp. was placed in its interior. Three replicates were established with ten larvae per replicate and a control without nematodes was included. The assay was incubated at 25 ± 1 °C and the readings of mortality were taken after 24 h. As mortality increased, the reading times were shortened (2, 1.5 and 1 h), to estimate the lethal time in which 50 % of the population died (LT50). The dead

que la mortalidad se incrementó, los tiempos de lectura se acortaron (2, 1.5 y 1 h). Lo anterior para estimar el tiempo letal en que murió el 50 % de la población (TL50). Las larvas muertas se colocaron en trampas White (Woodring y Kaya, 1988) para corroborar la emergencia de juveniles.

Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANVA) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. Se utilizó el programa estadístico SAS versión 1999.

Para corroborar la susceptibilidad o resistencia del insecto a los nematodos y bacterias, las larvas se inyectaron con 0.3 ml·larva⁻¹ de una suspensión de 1000 NE·ml⁻¹.

Ensayo con adultos

Este se ejecutó de manera similar al de las larvas, sólo que en este caso, en lugar del sustrato se utilizó una esponja de 0.5 cm de espesor en el fondo del recipiente. Se consideraron tres repeticiones más un testigo sin nematodos. Los adultos muertos se colocaron en trampas White para corroborar la emergencia de juveniles. Para estimar el tiempo en que murió el 50 % de la población (TL50), los datos se procesaron mediante análisis probit bajo un modelo doble cuadrático con el programa estadístico SAS.

Infectividad de *H. indica* en suelo

Dado que las características de los suelos afectan la actividad de los NE (Molyneux y Bedding, 1984; Hazir *et al.*, 2004), se consideró importante caracterizar tres tipos de suelos representativos del estado de Michoacán: "topure" y "charanda", colectados de la región aguacatera de Atapan,

larvae were placed in White traps (Woodring and Kaya, 1988) to corroborate the emergence of the juveniles.

The data was processed by means of an analysis of variance (ANOVA) and the comparison of means with the Tukey test at $P \leq 0.05$. The statistical program SAS version 1999 was used.

To confirm the susceptibility or resistance of the insect to the nematodes and bacteria, the larvae were injected with 0.3 ml·larvae⁻¹ of a suspension of 1000 EPNs·ml⁻¹.

Assay with adults

The assay was executed similar to that of the larvae, but in this case, instead of the substrate, a sponge of 0.5 cm thickness was used at the bottom of the recipient. Three replicates were considered plus a control without nematodes. The dead adults were placed in White traps to confirm the emergence of the juveniles. To estimate the time in which 50 % of the population died (LT50), the data were processed by means of probit analysis under a double quadratic model with the SAS statistical program.

Infectivity of *H. indica* in the soil

Given that the characteristics of the soils affect the activity of the EPNs (Molyneux and Bedding, 1984; Hazir *et al.*, 2004), it was considered important to characterize three types of soils representative of the state of Michoacán, "topure" and "charanda", collected in the avocado producing region of Atapan, Los Reyes, and a Vertisol-saline type soil ("Los negritos" soil) collected in the municipality of Villamar, Michoacán of the region Ciénaga de Chapala (Figure 1).

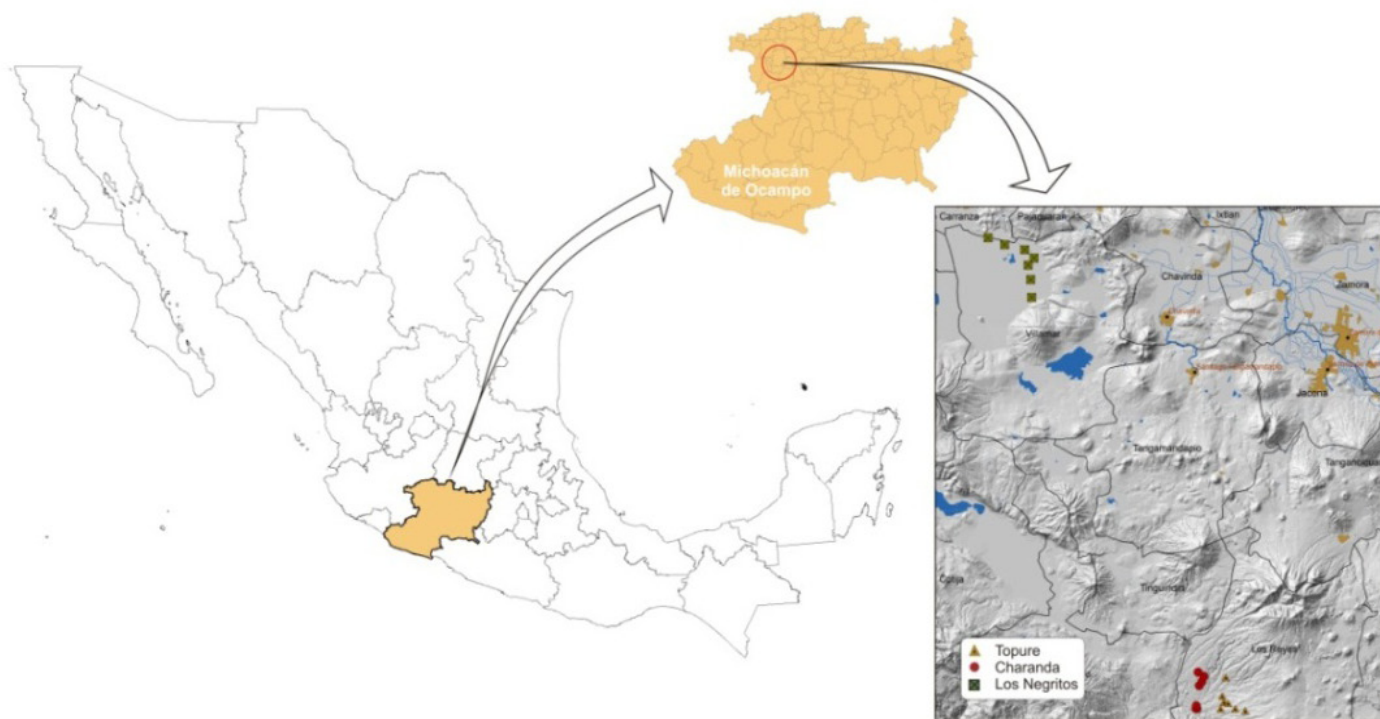


FIGURA 1. Tiempo de mortalidad *in vitro* de larvas de *Phyllophaga* sp. infectadas con el nematodo *Heterorhabditis indica* en suelo y en composta.

FIGURE 1. Time of mortality *in vitro* of larvae of *Phyllophaga* spp. infected with the nematode *Heterorhabditis indica* in soil and in compost.

Los Reyes Michoacán, y un suelo tipo Vertisol-salino (suelo “Los negritos”) colectado en el municipio de Villamar, Michoacán de la región Ciénega de Chapala (Figura 1).

Para cada suelo se obtuvieron siete muestras simples a 30 cm de profundidad. Se determinó textura, por el método del hidrómetro Bouyoucos (Van Reeuwijk, 1999); pH, mediante un potenciómetro y una relación 1:2 (Ansorena, 1994); conductividad eléctrica (CE), mediante extracto de saturación y puente de conductividad; densidad aparente, por el método de la probeta; densidad real, por el método del picnómetro (Aguilera y Martínez, 1986); porosidad, por cálculo, y materia orgánica, por el método micro-Kjeldahl (Van Reeuwijk, 1999).

Para los ensayos se utilizaron dos recipientes de plástico de 5 x 6 cm y mediante una aguja de disección se practicaron múltiples orificios en la base de uno de ellos; ambos recipientes se ensamblaron quedando el perforado en la parte superior. En el recipiente inferior se colocó 1 cm de suelo + cuatro larvas del último instar de *G. mellonella*, de modo que suelo y larvas quedaron limitados por la base del recipiente superior. Este se llenó con cada uno de los suelos, previamente humedecidos; inmediatamente, se colocó 1 ml de una suspensión de 1,500 nematodos·ml⁻¹. Se establecieron tres repeticiones por tratamiento y un testigo con sólo agua, fue considerado. Los ensayos se establecieron a temperatura ambiente y la revisión de la mortalidad inició 48 h después. Se realizó un análisis de varianza previa transformación al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, procesado mediante el paquete estadístico SAS versión 1999. Adicionalmente, para conocer la relación entre las diferentes características de los suelos evaluados y la mortalidad por el nematodo, se realizaron pruebas de correlación que fueron desarrolladas para cada variable.

RESULTADOS

Mortalidad de larvas por *H. indica*

Con la dosis evaluada (2,500 nematodos·ml⁻¹) la mayor mortalidad registrada después de cinco días de incubación fue de 46 y 40 % para los tratamientos suelo y composta, respectivamente. No se registraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos sustratos (Cuadro 1). Sin embargo, cuando se analizó el tiempo en que se alcanzó la máxima mortalidad, en el sustrato suelo se obtuvo 86 h después mientras que en composta fue a las 40 h (Figura 2).

Efecto del suelo en la infectividad de *H. indica*

En el resultado textural, los suelos topure y charanda mostraron un alto porcentaje de arena, seguida de limo y finalmente menor contenido de arcilla. Contrariamente, “Los negritos” presentan mayores contenidos de arcilla, seguido de arena y poca cantidad de limo. La clase textural fue franco-arenosa, areno-arcillosa y franco-arcillosa para los suelos topure, charanda y “Los negritos”, respectivamente. De igual modo, los suelos charanda y “Los negritos” pre-

For each soil seven simple samples were obtained at 30 cm depth. Texture was determined with the method of the Bouyoucos hydrometer (Van Reeuwijk, 1999); pH, using the potentiometer and a ratio of 1:2 (Ansorena, 1994); electric conductivity (EC), by saturation extract and conductivity bridge; apparent density, with the test tube method; real density with the pycnometer method (Aguilera and Martínez, 1986); porosity, by calculation, and organic matter, by the micro-Kjeldahl method (Van Reeuwijk, 1999).

For the assays, two plastic containers measuring 5 x 6 cm were used, and using a dissection needle, multiple orifices were made in the base of one of them; both containers were assembled with the perforated one on top. In the bottom container 1 cm of soil was placed + four larvae of the last instar of *G. mellonella*, so that soil and larvae were limited by the base of the top container. This was filled with

CUADRO 1. Mortalidad de larvas de *Phyllophaga* sp. en suelo y composta.

TABLE 1. Mortality of larvae of *Phyllophaga* spp. in soil and compost.

Tratamiento / Treatment	Mortalidad±Ds ² / Mortality±Ds ²
Suelo / Soil	46.67 ± 20.81 a
Composta / Compost	40.00 ± 10.00 a

² Medias de mortalidad ± desviación estándar, seguidas de la misma letra no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey, a una 0.05.

² Means of mortality ± standard deviation, followed by same letter do not differ according to the Tukey test at a 0.05.

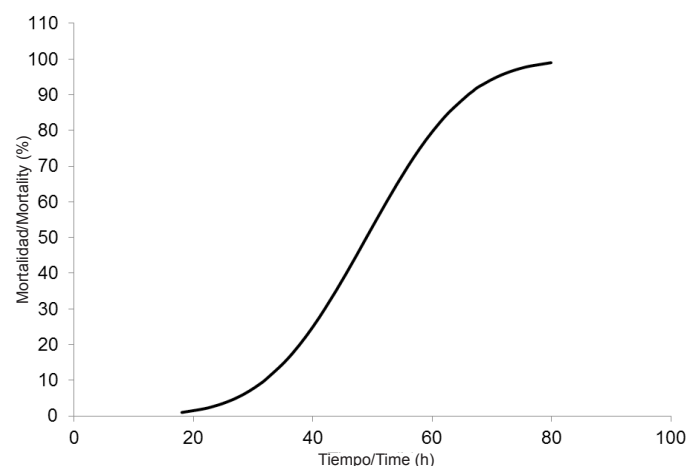


FIGURA 2. Ubicación de las áreas de colecta de diferentes tipos de suelo del estado de Michoacán, México.

FIGURE 2. Location of the collection areas of different soil types of the state of Michoacán, Mexico.

each of the soils, previously moistened; immediately, 1 ml of a suspension of 1,500 nematodes·ml⁻¹ was added. Three replicates per treatment were established and a control with only water was considered. They were established at room temperature and the revision of mortality began 48 h later.

An analysis of variance was made prior to transformation to the arcsine of the square root of the proportion, processed by means of the SAS statistical package version

sentaron un mayor porcentaje de materia orgánica que el topure (Cuadro 2).

La combinación de materia orgánica y clase textural dio como resultado una densidad aparente baja, tal como se presentó en el topure. Asimismo, el mayor porcentaje de porosidad se registró en topure, seguido de charanda y el menor en “Los negritos”. Los suelos de charanda y topure fueron moderadamente ácidos y libres de sales. Por el contrario, “Los negritos” se clasificaron como extremadamente alcalinos, con alto contenido de sales (Cuadro 2).

CUADRO 2. Características físico-químicas de tres suelos regionales de Michoacán, México.

TABLE 2. Physio-chemical characteristics of the three regional soils of Michoacán, Mexico.

Tipo de suelo/ Soil type	Textura / Texture (%)			Clase textural/ Textural class	Da ^z (g/ cm ³)	Porosidad/ Porosity (%)	MO ^y (%)	pH	CE (dS)
	Arena/ Sand	Limo/ Loam	Arcilla/ Clay						
Charanda	49.04	28.94	22.01	Areno arcilloso/ Sandy loam	1.07	54.29	3.77	5.85	1.12
Topure	53.04	34.13	12.70	Franco arenoso/ Sandy-loam	0.99	58.75	3.16	6.04	1.52
Suelo los Negritos / Los Negritos soil	35.18	14.13	50.68	Franco arcilloso/ clay loam	1.05	42.30	4.25	9.33	8.28

^z Densidad aparente / ^z Apparent density

^y Materia orgánica / ^y Organic matter

De acuerdo con lo anterior, los suelos que mayormente favorecieron la actividad de *H. indica* fueron charanda y topure, con mortalidades de 88.09 ± 2.06 y 83.33 ± 4.1 , respectivamente, sin registrar diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre ambos. El suelo “Los negritos” fue el menos propicio para la actividad del nematodo, con una mortalidad de larvas de 18.75 ± 6.25 (Cuadro 3).

De acuerdo con los índices de correlación (r) obtenidos ($P \leq 0.05$), con excepción de la densidad aparente, todas las características evaluadas en los suelos influyeron significativamente en la actividad de los nematodos. De las características físicas, los mayores porcentajes de arena y limo, aunado con una mayor porosidad en los suelos topure y charanda propiciaron la mayor actividad de los nematodos en ellos. Contrariamente, los mayores contenidos de arcilla y materia orgánica en “Los negritos” explican en parte la menor mortalidad ocasionada por *H. indica*. Además, los mayores niveles de pH y CE influyeron en gran medida con los resultados de la actividad del nematodo en dichos suelos (Cuadro 4).

Mortalidad de adultos por *H. indica*

A diferencia de las larvas, los adultos de gallina ciega fueron más susceptibles al nematodo *H. indica*. No obstante la alta susceptibilidad de los adultos, en ninguno de los ejemplares muertos se obtuvieron juveniles infectivos. La única evidencia de que los adultos de gallina ciega fueron muertos por el nematodo, fue la ausencia de olor putrefacto y el no haber registrado mortalidad en el testigo. El tiempo en que murió el 50 % de la población (TL50) se estimó

1999. Additionally, to know the relationship between the different characteristics of the soils evaluated and the mortality by the nematode, correlation tests were developed for each variable.

RESULTS

Mortality of larvae by *H. indica*

With the evaluated dose (2,500 nematodes·ml⁻¹) the highest mortality registered after five days of incubation

was 46 and 40 % for the soil and compost treatments, respectively. No significant differences were registered ($P \leq 0.05$) between the two substrates (Table 1). However, when the time in which maximum mortality was analyzed, in the soil substrate it was obtained 86 hours later, whereas in the compost it was obtained at 40 h (Figure 2).

Effect of the soil on the infectivity of *H. indica*

In the textural result, the topure and charanda soils presented a high percentage of sand, followed by loam and finally a lower content of clay. In contrast, “Los negritos” present higher contents of clay, followed by sand and a small amount of loam. The textural class was sandy-loam, sandy-clay and clay-loam for the topure, charanda and “Los negritos” soils, respectively. Similarly, the charanda and “Los negritos” soils presented a higher percentage of organic matter than the topure (Table 2).

The combination of organic matter and the textural class resulted in an apparently low density, as occurred in the topure. In addition, the highest percentage of porosity was registered in topure, followed by charanda and the lowest in “Los negritos”. The charanda and topure soils were moderately acid and free of salts. In contrast, “Los negritos” were classified as extremely alkaline, with a high salt content (Table 2).

According to the above, the soils that most favored the activity of *H. indica* were charanda and topure, with mortalities of 88.09 ± 2.06 % and 83.33 ± 4.1 %, respectively, without registering statistical differences ($P \leq 0.05$)

en 48.97 h (47.49 – 51.34 h), mientras que el 99 % fue 79.9 h después (71.05–97.99 h) (Figura 3).

DISCUSIÓN

Los síntomas de las larvas de gallina ciega parasitadas por el nematodo fueron los característicos para el género *Heterorhabditis*: disminución en su movilidad y posteriormente la muerte, ausencia de olor, coloración rojo ladrillo y nueve días después, la emergencia de juveniles (J3) del nematodo (Tanada y Kaya, 1993).

Con base en mediciones (2.4-3.3 cm), las larvas de gallina ciega se encontraban en tercer instar larvario (Aragón-García, 2005; Ramírez-Salinas *et al.*, 2009), mismo que es mencionado como la etapa larvaria más resistente a los NE (Rodríguez *et al.*, 2009), lo que podría explicar la baja mortalidad obtenida en el presente estudio. Aunque pudiera pensarse que el poco tiempo de exposición de las larvas a los nematodos (cinco días) pudo haber influido también en la mortalidad. Otros estudios con mayor tiempo de exposición han reportado mortalidades similares a las obtenidos en este estudio. Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2009) registraron mortalidades del 24 %, a los 30 días después de exponer larvas del tercer estadio de *P. elenans* a dosis de 625 nematodos-larva⁻¹.

Diversas causas pueden explicar las diferencias en el grado de susceptibilidad entre los estados de desarrollo de las especies de larvas de gallina ciega. Entre ellas, se mencionan características morfológicas y fisiológicas, comportamientos defensivos y evasivos de las larvas, y fuerte respuesta inmune asociada a la edad, donde los es-

CUADRO 3. Infectividad de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis indica* en tres suelos de Michoacán, México.

TABLE 3. Infectivity of *Galleria mellonella* by *Heterorhabditis indica* in three soils of Michoacán, Mexico.

Tipo de suelo / Soil type	Mortalidad ± Ds ² / Mortality ± Ds ²
Areno-arcilloso/ Sandy-clay (Charanda)	88.09 ± 2.06 a
Franco-arenoso/ Sandy-loam (Topure)	83.33 ± 4.10 a
Franco-arcilloso/Clay-loam (Los negritos)	18.75 ± 6.25 b

² Medias ± desviación estándar, seguidas de la misma letra, no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey, a una 0.05.

² Means ± standard deviation, followed by the same letter, do not differ according to the Tukey test, at a 0.05.

between the two. The “Los negritos” soil was the least propitious for the activity of the nematode, with a mortality of larvae of 18.75 ± 6.25 % (Table 3).

According to the indices of correlation (r) obtained ($P \leq 0.05$), with the exception of the apparent density, all of the characteristics evaluated in the soils significantly influenced the activity of the nematodes. Of the physical characteristics, the highest percentages of sand and loam, added to a higher porosity in the topure and charanda soils, propitiated the highest activity of the nematodes. In contrast, the higher content of clay and organic matter in “Los negritos” partially explains the lower mortality caused by *H. indica*. Furthermore, the higher levels of pH and EC influenced to a large degree the results of the activity of the nematode in these soils (Table 4).

CUADRO 4. Índices de correlación (r), entre la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por el nematodo *Heterorhabditis indica* y las características físico-químicas de tres suelos de Michoacán ($P \leq 0.05$).

TABLE 4. Indices of correlation (r) between mortality of larvae of *Galleria mellonella* by the nematode *Heterorhabditis indica* and the physiochemical characteristics of three soils of Michoacán ($P \leq 0.05$).

Arena / Sand (%)	Limo / Loam (%)	Arcilla / Clay (%)	Da ²	Por ³ (%)	MO ⁴ (%)	pH	C.E. / E.C
0.96	0.57	- 0.95	-0.21	0.94	- 0.79	- 0.99	-0.99

² Densidad aparente / ² Apparent density

³ Porosidad / ³ Porosity

⁴ Materia orgánica / ⁴ Organic matter

tados iniciales del insecto poseen una respuesta de anticuerpos más baja que los estados maduros (Koppenhöffer *et al.*, 2006). La inyección con suspensiones de nematodos confirmaron la resistencia de las larvas de *Phyllophaga* spp. al nematodo *H. indica*, pues la mortalidad fue similar (42.85 %) a la registrada en los ensayos con sustrato (40.00 - 46.67 %).

A diferencia de las larvas, con los adultos no fue fácil detectar los que fueron muertos por el nematodo. Dado el color de los adultos de gallina ciega, muy similar al presentado por los insectos muertos por nematodos del género

Mortality of adults by *H. indica*

Contrary to the larvae, the adults of white grub were more susceptible to the nematode *H. indica*. Despite the high susceptibility of the adults, no infective juveniles were obtained in the dead specimens. The only evidence that the white grub adults were killed by the nematode was the absence of a rotten odor and the fact that no mortality was registered in the control. The time in which 50 % of the population died (LT50) was estimated at 48.97 h (47.49 – 51.34 h), while 99 % was 79.9h later (71.05-97.99 h) (Figure 3).

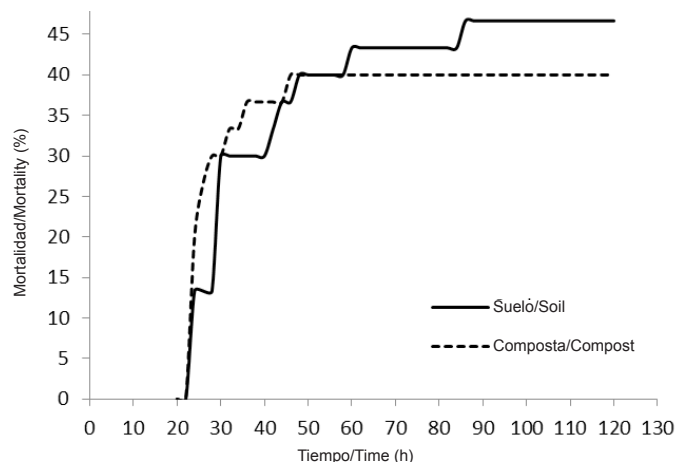


FIGURA 3. Tiempo estimado de mortalidad de adultos de *Phyllophaga* spp. infectados con el nematodo *Heterorhabditis indica*.

Figure 3. Estimated time of mortality of adults of *Phyllophaga* spp. infected with the nematode *Heterorhabditis indica*.

Heterorhabditis (rojo ladrillo), y la ausencia de juveniles infectivos en los cadáveres, la muerte del insecto por nematodos sólo se constató por la ausencia de olor putrefacto y la ausencia de mortalidad en el testigo. Con la dosis evaluada (2,500 nematodos·ml⁻¹) los tiempos de mortalidad sobrepasan ligeramente los mencionados para otros insectos susceptibles a NE (Tanada y Kaya, 1993).

Con base en los resultados, puede decirse que los adultos de *Phyllophaga* spp. fueron más susceptibles al nematodo *H. indica* que las larvas, lo que indica que la bacteria mutualista del nematodo actuó sin dificultad. Sin embargo, condiciones fisiológicas del insecto pudieran no ser aptas para la reproducción de los juveniles. En este caso, pudo ser que existieron componentes específicos que afectaron el desarrollo de los nematodos; o bien, que los adultos de *Phyllophaga* capturados en las trampas de luz, por ser de reciente emergencia, no contaran con las reservas de energía suficiente para la reproducción del nematodo. Entonces, la mayor susceptibilidad de los adultos respecto a las larvas pudiera entenderse en principio por las diferencias en las características morfológicas de larvas y adultos de gallina ciega. Sin embargo, dada la ausencia de trabajos previos, las causas precisas no pueden ser explicadas.

Diversos estudios han sido enfocados al control de larvas de gallinas ciegas, incluidos los relacionados con nematodos entomopatógenos (Koppenhöffer y Fuzy, 2003; Ceccon *et al.*, 2004; Koppenhöffer *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009), y muy pocos se han enfocado al control del estado adulto (Badilla *et al.*, 1999; Toledo, 2002; Aragón-García *et al.*, 2008), pero ninguno de ellos ha sido con base en nematodos entomopatógenos.

El conocer la susceptibilidad de adultos de *Phyllophaga* hacia NE abre la posibilidad del manejo de la plaga mediante el cebado de trampas con esos entomopatógenos. Al respecto, se sabe que una de las técnicas promisorias

DISCUSSION

The symptoms of the larvae of white grub infected with the nematode were those characteristic for the genus *Heterorhabditis*: reduction of their mobility and later their death, absence of odor, brick red color and nine days later, the emergence of juveniles (J3) of the nematode (Tanada and Kaya, 1993).

Based on measurements (2.4-3.3 cm), the white grub larvae were found in third larval instar (Aragón-García, 2005; Ramírez-Salinas *et al.*, 2009), which is mentioned as the larval stage that is most resistant to the EPNs (Rodríguez *et al.*, 2009), which could explain the low mortality obtained in the present study. However, it could be considered that the short time of exposure of the larvae to the nematodes (five days) could also have influenced mortality. Other studies with longer exposure time have reported mortalities similar to those obtained in the present study. For example, Rodríguez *et al.* (2009) registered mortalities of 24 %, 30 days after exposing the larvae of the third stage of *P. eleanans* to doses of 625 nematodes·larva⁻¹.

Diverse causes can explain the differences in the degree of susceptibility among the development stages of the species of white grub larvae. Among them, morphological and physiological characteristics are mentioned, along with defensive and evasive behavior of the larvae, and a strong immune response associated with age, where the initial stages of the insect have a lower immune response than the mature stages (Koppenhöffer *et al.*, 2006). Injection with suspensions of nematodes confirm the resistance of the larvae of *Phyllophaga* spp. to the nematode *H. indica*, as the mortality was similar (42.85 %) to that registered in the assays with substrate (40.00 – 46.67 %).

Contrary to the larvae, with the adults it was not easy to detect those that were killed by the nematode. Given the color of the adults of white grub, very similar to that presented by the insects killed by nematodes of the genus *Heterorhabditis* (brick red), and the absence of infective juveniles in the cadavers, the death of the insect by nematodes was only indicated by the absence of rotten odor and the absence of mortality in the control. With the dose evaluated (2,500 nematodes·ml⁻¹) the mortality times slightly surpass those mentioned for other insects susceptible to EPNs (Tanada and Kaya, 1993).

Based on the results, it can be said that the adults of *Phyllophaga* spp. were more susceptible to the nematode *H. indica* than the larvae, which indicates that the mutualistic bacteria of the nematode acted without difficulty. However, physiological conditions of the insect may not be apt for the reproduction of the juveniles. In this case, it may be that there were specific components that affected the development of the nematodes, or rather, that the adults of *Phyllophaga* captured in the light traps, due to their recent emergence, did not have the reserves of energy needed for the reproduction of the nematode. Therefore, the higher susceptibility of the adults with respect to the larvae could be understood in principle by the differences in the

para la aplicación y dispersión de entomopatógenos es mediante los mismos insectos, ya sea con la misma especie plaga como vector o mediante especies diferentes a la plaga (Vega *et al.*, 2000; Smagghe *et al.*, 2012). Para adultos de *Phyllophaga* sólo un estudio ha sido documentado mediante el cebado de trampas con hongos entomopatógenos, al parecer con resultados promisorios (Vázquez, 2000, citado por Pardo-Locarno y Montoya, 2007).

Las ventajas de la técnica de autodiseminación o del entomovector son diversas, pero entre ellas destacan la reducción en la cantidad de bioinsecticida, la menor mano de obra y, principalmente, la aplicación con bajas poblaciones de la plaga. Todo ello finalmente, busca eficientar el control en términos económicos (Smagghe *et al.*, 2012). Dada la ausencia de productores de nematodos entomopatógenos en México y la indudable importancia que dichos organismos tienen en el control de plagas (Kaya *et al.*, 2006), la estrategia aquí planteada es ampliamente justificada. Pruebas preliminares indican que el nematodo *H. indica* fue capaz de sobrevivir en esponjas con agua dentro de recipientes de plástico expuestos al sol por al menos una semana. De igual modo, el tiempo requerido para que el nematodo infectara adultos de la plaga fluctuó entre 15 a 30 min. Sin embargo, la ausencia de juveniles en los cadáveres de adultos de gallina ciega muertos por *H. indica* limita por el momento dicha idea, por lo que estudios futuros deben enfocarse a conocer las causas de ese fenómeno.

La actividad de los nematodos entomopatógenos es fuertemente influida por las características del suelo (Stuart *et al.*, 2006), tal como fue constatado en el presente estudio con los altos índices de correlación encontrados entre la mortalidad por *H. indica* y las diferentes características fisicoquímicas de los suelos, principalmente con la textura, el pH y la CE. Al respecto, se ha mencionado que las texturas arenosas y francas favorecen la actividad de los nematodos, mientras que suelos con alto contenido de arcilla interfieren con el desplazamiento de los juveniles debido a que el tamaño del poro entre las partículas de arcilla es menor que el diámetro del cuerpo de los nematodos (Stuart *et al.*, 2006). *H. indica* es de los nematodos más pequeños, con un diámetro de 0.50 mm (Poinar *et al.*, 1992). También, la actividad y supervivencia de los NE es menor en suelos arcillosos que en los franco-arenosos (Molyneux y Bedding, 1984; Stuart *et al.*, 2006), probablemente debido a los bajos niveles de oxígeno en suelos con poros más pequeños como suelen ser los arcillosos (Hazir *et al.*, 2004).

Molyneux y Bedding (1984) mostraron que en suelos franco-arenosos con niveles bajos de humedad, las larvas de *Lucilia cuprina* presentaron una alta infección por las especies *Heterorhabditis* sp. y *Steinernema glaseri*, mientras que en suelos arenosos y franco-arcillosos no se registró mortalidad. Con niveles de humedad cercanos a la saturación la infección fue más alta en arena fina que en los otros dos tipos de suelo. Ambas especies de nematodos parasitaron un número similar de larvas de *L. cuprina* en el suelo arenoso y franco-arenoso, pero en el franco-arcilloso

morphological characteristics of larvae and adults of white grub. However, given the absence of previous studies, the precise causes cannot be explained.

Diverse studies have been focused on the control of larvae of white grub, including those related to entomopathogenic nematodes (Koppenhöffer and Fuzy, 2003; Ceccon *et al.*, 2004; Koppenhöffer *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009), and very few have been focused on the control of the adult stage (Badilla *et al.*, 1999; Toledo, 2002; Aragón-García *et al.*, 2008), but none of them have been based on entomopathogenic nematodes.

Knowing the susceptibility of adults of *Phyllophagus* toward EPNs opens the possibility of the management of the pest by means of baiting traps with these entomopathogens. To this respect, it is known that the promising techniques for the application and dispersal of entomopathogens is by means of the same insects, either with the same pest species as vector or using species that are different from the pest (Vega *et al.*, 2000; Smagghe *et al.*, 2012). For adults of *Phyllophaga* only one study has been documented of baiting traps with entomopathogenic fungi, apparently with promising results (Vázquez, 2000, cited by Pardo-Locarno and Montoya, 2007).

The advantages of the technique of self-dissemination or of the entomovector are diverse, but outstanding among them are the reduction of the amount of bio-insecticide, reduction in the amount of labor and mainly, the application with low populations of the pest. All of the above are aimed at making the control more efficient in economic terms (Smagghe *et al.*, 2012). Given the absence of producers of entomopathogenic nematodes in Mexico and the undeniable importance that these organisms have in the control of pests (Kaya *et al.*, 2006), the strategy proposed here is amply justified. Preliminary tests indicate that the nematode *H. indica* was capable of surviving in sponges with water within plastic containers exposed to the sun for at least a week. Similarly, the time required for the nematode to infect adults of the pest fluctuated between 15 and 30 min. However, the absence of juveniles in the cadavers of adults of white grub killed by *H. indica* limits this idea for the moment, therefore future studies should focus on knowing the causes of this phenomenon.

The activity of entomopathogenic nematodes is strongly influenced by the characteristics of the soil (Stuart *et al.*, 2006), as was demonstrated in the present study with the high indices of correlation found between mortality by *H. indica* and the different physiochemical characteristics of the soils, principally with texture, pH and EC. To this respect, it has been mentioned that the sandy and loamy textures favor the activity of the nematodes, whereas the soils with high clay content interfere with the displacement of the juveniles due to the fact that the pore between the clay particles is smaller than the diameter of the body of the nematodes (Stuart *et al.*, 2006). *H. indica* is one of the smallest nematodes, with a diameter of 0.50 mm (Poinar *et*

Heterorhabditis parasitó más que *S. glaseri*, lo que sugiere que el efecto del suelo depende también de la especie de nematodo y de las condiciones de humedad.

Aunque se menciona que la química y pH de la solución del suelo puede afectar a los NE, se ha visto también que niveles alcalinos (10) o ácidos (5.6) pueden reducir su sobrevivencia, mientras que valores cercanos a la neutralidad serían los más adecuados (Stuart *et al.*, 2006). En este estudio, la menor mortalidad ocasionada por *H. indica* ocurrió en el suelo con un pH cercano a 10. La CE da información acerca de la salinidad del suelo, por lo que valores bajos serían también adecuados para los nematodos. Sin embargo, existen especies altamente tolerantes a la salinidad (Griffen *et al.*, 1994) como suponemos es el caso del nematodo utilizado *H. indica*, que aunque no se comparó con otras especies, sí **logró infectar** larvas de *G. mellonella*, aún en suelos con elevados pH y CE, como fue el caso del suelo "Los negritos".

El hecho de que *H. indica* pueda infectar y matar larvas y adultos de gallina ciega, y que su actividad infectiva se mantuvo en los tres tipos de suelo evaluados (representativos de Michoacán), sugiere que *H. indica* pudiera ser considerado para el manejo de la plaga en diferentes cultivos de la región. Los suelos topure y charanda, donde el nematodo mostró alta infectividad, son representativos de la meseta purépecha, región donde se producen importantes cultivos como aguacate y durazno. Los suelos vertisoles (Los negritos) son representativos de la región Ciénega de Chapala, y muchos de esos suelos presentan ya diferentes grados de salinidad. En ambas regiones, el complejo de especies de gallina ciega es un problema agrícola importante y los nematodos podrían formar parte de un manejo integrado de la plaga. Sin embargo, estudios futuros sobre dosis y técnicas de aplicación deben ser abordados.

CONCLUSIONES

El nematodo *H. indica* fue capaz de infectar y matar larvas y adultos de *Phyllophaga* spp.

La mortalidad del tercer estadio larvario varió de 40 – 46 %, con tiempos de mortalidad final de 40 y 86 h, para composta y suelo, respectivamente.

Los adultos de *Phyllophaga* spp., fueron altamente susceptibles al nematodo. El TL50 estimado fue de 48.79 h, y la máxima mortalidad (99 %) se alcanzó en 79.9 h. Sin embargo, en ningún caso se obtuvieron juveniles del nematodo.

Los suelos que favorecieron la infectividad de *H. indica* fueron los franco-arenosos (topure) y areno-arcillosos (charanda), mientras que los suelos franco-arcillosos salinos interfirieron con la infectividad del nematodo.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico por el financiamiento de la presente inves-

al., 1992). In addition, the activity and survival of the EPNs is lower in clay soils than in the sandy-loam soils (Molyneux and Bedding, 1984; Stuart *et al.*, 2006), probably due to the low levels of oxygen in soils with smaller pores such as the clay soils tend to be (Hazir *et al.*, 2004).

Molyneux and Bedding (1984) demonstrated that in sandy-loam soils with low levels of moisture, the larvae of *Lucilia cuprina* presented a high level of infection by species of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema glaseri*, while in sandy and loam-clay soils no mortality was registered. With moisture levels close to saturation, the infection was higher in fine sand than in the other two types of soil. Both species of nematodes infect a similar number of larvae of *L. cuprina* in the sandy and sandy-loam soil, but in the clay-loam soil *Heterorhabditis* infects more than *S. glaseri*, which suggests that the effect of the soil also depends on the species of nematode and the moisture conditions.

Although it is mentioned that the chemistry and pH of the soil solution can affect the EPNs, it has also been observed that alkaline (10) or acid (5.6) levels can reduce their survival, while the values close to neutrality are the most adequate (Stuart *et al.*, 2006). In this study, the lowest mortality caused by *H. indica* occurred in the soil with a pH close to 10. The EC gives information of the salinity of the soil, thus low values would also be adequate for the nematodes. However, there are species that are highly tolerant to salinity (Griffen *et al.*, 1994), as we assume is the case of the nematode used, *H. indica*, which although it didn't compare with other species, it did infect larvae of *G. mellonella*, even in soils with high pH and EC, as was the case of the "Los negritos" soil.

The fact that *H. indica* can infect and kill larvae and adults of white grub, and that their infective activity was maintained in the three types of soil evaluated (representative of Michoacán), it suggests that *H. indica* could be considered for the management of the pest in different crops of the region. The topure and charanda soils, where the nematode presented high infectivity, are representative of the Purépecha plateau, region where important crops are produced such as avocado and peach. The vertisol soils (Los negritos) are representative of the region Ciénega de Chapala, and many of these soils present different degrees of salinity. In both regions, the white grub species complex is an important agricultural problem and the nematodes could form part of an integrated management of the pest. However, future studies should be made of doses and application techniques.

CONCLUSIONS

The nematode *H. indica* was capable of infecting and killing larvae and adults of *Phyllophaga* spp.

The mortality of the third larval stage varied from 40 – 46 %, with final mortality times of 40 and 86 h, for compost and soil, respectively.

tigación. Al Dr. Miguel Ángel Morón Ríos por el apoyo en la identificación de los especímenes.

LITERATURA CITADA

- ABARCA, G.; QUESADA, M. 1997. Especies del complejo de jobotos (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.) asociados a cultivos, en el Valle Central y Pacífico seco de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 8(2): 44-53.
- AGUILERA, C. M.; MARTÍNEZ, E. R. 1986. Relaciones Agua Suelo Planta Atmósfera. 3ª Edición. Departamento de Irrigación. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 153 p.
- ANSORENA, M. J. 1994. Sustratos Propiedades y Caracterización. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 172 p.
- ARAGÓN-GARCÍA, A.; MORÓN, A.; TAPIA-ROJAS, A.; ROJAS-GARCÍA, R. 2001. Fauna de coleópteros Melolonthidae en el rancho "La Joya" Atlitico, Puebla, México. *Acta Zoológica Mexicana* 83 (083): 143-164.
- ARAGÓN-GARCÍA, A.; NOCHEBUENA-TRUJILLO, C.; MORÓN, M.; LÓPEZ-OLGUÍN, J. 2008. Uso de trampas de luz fluorescente para el manejo de la gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia* 42: 217-223.
- ARAGÓN-GARCÍA, A.; MORÓN, M.; LÓPEZ-OLGUÍN, J.; CERVANTES-PEREDO, L. 2005. Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta Zoológica Mexicana* 21(2): 87-99.
- BADILLA, F.; CHACÓN, M.; SÁENZ, C. 1999. Utilización de trampas de luz para la captura de adultos de *Phyllophaga* spp. en caña de azúcar, en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 51:1-6.
- CAMPOS-HERRERA, R.; STUART, R. J.; EL-BORAI, F.; GUTIÉRREZ, C.; DUNCAN, L. 2010. Entomopathogenic nematode ecology and biological control in Florida citrus orchards, pp. 101-123. In: Integrated management of arthropod pests and insect borne diseases. CIANCIO, A.; MUKERJI, K.G. (eds.). Springer. London-New York.
- CASTAÑEDA Z., Y. 2009. Para los productores maiceros de México ¿Un maíz transgénico? *Sociedades rurales, Producción y Medio ambiente* 9(17): 54-88.
- CECCON, G.; RAGA, A.; PEREIRA-DURTE, A.; CÁSSIO-SILOTO, R. 2004. Efeito de inseticidas na semeadura sobre pragas iniciais e produtividade de milho safrinha em platio direto. *Bragatía: Revista de Ciencias Agronómicas* 63 (002):227-287.
- COTO, D. 2000. Gallinas ciegas como plagas de cultivos anuales y perenes. *Hoja Técnica Núm. 32. Manejo Integrado de Plagas* (55): i-iv.
- GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A.; LACEY, L.; BALAIR, G.; DUNCAN, L.; GREWAL, P.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; TOL, R. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control* 38: 103-123.
- GRIFFEN, C. T.; FINNEGAN, M. M.; DOWNES, M. J. 1994. Environmental tolerances and the dispersal of *Heterorhabditis*: survival and infectivity of European *Heterorhabditis* following prolonged immersion in seawater. *Fundam. Appl. Nematol.* 17(5): 415-421.
- HAZIR, S.; KAYA, H.; STOCK, P.; KESKÜN, N. 2004. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turk. J. Biol.* 27: 181-202.
- KAYA, H. K.; AGUILLERA M., M.; ALIMAI, A.; CHOO, H. Y.; DE LA TORRE, M.; FODOR, A.; GANGULY, S.; HAZAR, S.; LAKATOS, T.; PYE, A.; WILSON, M.; YAMANAKA, S.; YANG, H.; EHLERS, R. U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38: 134-155.
- KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. 1984. Las Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central. Administración de Desarrollo Extranjero (ODA). Londres. 189 p.
- KOPPENHÖFER A. M.; FUZY E. M. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control* 28: 47-59.
- KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P. S.; 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.
- LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAIL, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21: 230-248.
- LUGO-GARCÍA, G. A.; ORTEGA-ARENAS, L. D.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H.; ARAGÓN-GARCÍA, A.; ROMERO-NÁPOLES, J.; RUBIO-CORTÉS, R.; MORÓN, M. Á. 2011. Melolonthidae nocturnos (Coleoptera) Recolectados en la zona agrícola agavera de Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 27(2): 341-357.
- MARÍN J., A.; BUJANOS M., R. 2008. Especies del complejo "gallina ciega" del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México* 34(3): 349-355.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Secretaría de Investigación y Posgrado of the Instituto Politécnico Nacional for financing the present investigation. We are also grateful to Dr. Miguel Ángel Morón Ríos for the support in the identification of the specimens.

End of English Version

- McCOY, C. W.; SHAPIRO, D. I.; DUNCAN, L. W.; NGUYEN, K. 2000. Entomopathogenic Nematodes and Other Natural Enemies as Mortality Factors for Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control* 19: 182–190.
- MOLYNEUX, A. S.; BEDDING, R. A. 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the Sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica* 30: 358–36.
- MORÓN, M. A. 1997. Melolonthinidae. Diagnósis, generalidades, hábitos y distribución, pp. 205–264. *In*: Atlas de los escarabajos de México. MORÓN, M.; RATCLIFFE, B.; DELOYA, C. (eds.). S y G editores. México. 280 p.
- PARDO-LOCARNO, L. C.; MONTOYA L., J. 2007. Ciclo de vida, importancia agrícola y manejo integrado de la chisa rizófaga *Phyllophaga menetriesi* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae), en Cauca y Quindío, Colombia. *Acta Agronómica* (56): 4: 195–202.
- PÉREZ-AGIS, S.; MORÓN, M.; NÁJERA-RINCÓN, M.; LÓPEZ-BARBOSA E.; VÁZQUEZ-GARCÍA, M. 2008. Análisis de diversidad del complejo “Gallina Ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en dos sistemas de producción tradicional de maíz en la región purépecha, Michoacán. *Acta Zoológica Mexicana* 24 (001): 221–235.
- PIMENTEL, D.; EDWARDS, C. A. 1982. Pesticides and ecosystems. *Bioscience* 32(7): 595–600.
- POINAR, G. O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamental and Applied Nematology* 15 : 467–472.
- RAMÍREZ–SALINAS, C.; CASTRO-RAMÍREZ. 2000. El complejo “Gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en el Madronal, municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* (079): 17–41.
- RAMÍREZ-SALINAS, C.; MORÓN, M.; CASTRO-RAMÍREZ, A.; PACHECO-FLORES, C. 2009. Descripción de la larva de *Phyllophaga (Phytalus) rufotestacea* (Moser) (Coleoptera: Melolonthidae) en Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* 25 (1): 1–8.
- RODRÍGUEZ, D.; TORRES, M.; URIBE, L.; FLORES, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 Y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 33 (2): 171–182.
- ROMERO-LÓPEZ, A. A.; MORÓN M. A.; ARAGÓN, A.; VILLALOBOS, F. J. 2010. La “Gallina Ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) Vista Como Un “Ingeniero del Suelo”. *Southwestern Entomologist* 35(3): 331–343.
- SEEFOÓ L., J. L. 2005. La Calidad es Nuestra, la Intoxicación... ¡de Usted! El colegio de Michoacán. Zamora, Michoacán, México. 348 p.
- SMAGGHE, G.; MOMMAERTS, V.; HOKKANEN, H.; MENZLER-HOKKANEN, I. 2012. Multitrophic interactions: the entomovector technology, pp. 127–157. *In*: Arthropod-plant interactions: novel insights and approaches for IPM, progress in biological control. SMAGGHE, G.; DIAZ, I. (eds.). Springer. New York-London. 226 p.
- STUART, R. J.; BARBERCHECK, M. E.; GREWAL, P. S.; TAYLOR, R. A. J.; HOY, C. W. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biological Control* 38: 80–102.
- TANADÁ, Y.; KAYA, H. K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc. San Diego, CA. 666 p.
- TOLEDO, M. 2002. Uso de barreras físicas para evitar la oviposición de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) en fresa. *Nota técnica. Agronomía Mesoamericana* 13(1): 55–58.
- VAN REEUWIJK, L. P. 1999. *Procedures for Soil Analysis*. International Soil Reference and Information Centre. Wageningen, Netherlands. 120 p.
- VEGA, F. E.; DOWD, P. F.; LACEY, L. A.; PELL, J. K.; JACKSON, D. M.; KLEIN, M. G. 2000. Dissemination of beneficial microbial agents by insects, pp. 153–177. *In*: LACEY L. A.; KAYA, H. K. (eds.). *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Kluwer Academic. Dordrecht, The Netherlands.
- WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. 1988. Steinernematidae and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. *Bulletin* 331. Arkansas Agriculture Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. 28 p.