

Nemátodos Entomopatógenos y Hongos del Suelo Con Potencial Antagónico a Nemátodos Entomopatógenos Asociados a Cítricas

Por

José Miguel García Peña

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN
PROTECCION DE CULTIVOS**

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2009**

Aprobado por:

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

David Jenkins, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Nydia E. Vicente, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José A. Chavarría-Carvajal, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Matías Cafaro, Ph.D.
Representante Escuela Graduada

Fecha

Hipólito O’Farrill, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Abstract

The use of entomopathogenic nematodes (EPN) to control insect pests in the soil is a common practice. The objectives of this investigation were to characterize the communities of EPN associated with citrus cultivation, identify the species of fungi with antagonistic potential against soil nematodes associated with citrus, and evaluate the susceptibility of *Diaprepes abbreviatus* to native *Rhabditis* spp. nematodes and the introduced EPNs *Steinernema glaseri* (NJ93 isolate) and *Heterorhabditis bacteriophora*. Samples were collected twice from five citrus orchards at the Agricultural Experiment Stations in Isabel and Adjuntas. The first was conducted from September to November 2007 and the second from April to May 2008. Nematode extraction was performed using *Galleria mellonella* larvae. Fungi isolation from the soil was achieved by performing serial dilutions up to 10^{-3} . A one ml aliquot of the dilution was then placed on Rose Bengal Streptomycin Agar. The fungal colonies were counted and expressed as $\log_{10}$ ufc/g of dry soil. To evaluate the susceptibility of *D. abbreviatus* to the EPNs and to the *Rhabditis* spp., *D. abbreviatus* larvae were inoculated with 10 IJ/cm^2 of soil of each nematode species in sterile soil. For the combined treatments half of the dose was used; water was used for control. Mortality was evaluated at 2, 5 and 10 days. In none of the sampled soils were EPNs observed, but nematodes in the genus *Rhabdita* were consistently isolated from cadavers that had been exposed to collected soil samples. The fungi most frequently isolated and identified were: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxiporum*, *Gliocladium catenulatum*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma viride* and *Verticillium* spp. There was no interaction between *Rhabditis* spp. and the EPNs. *H. bacteriophora* and *S. glaseri* (NJ93 isolate). *H. Bacteriophora* showed the greatest efficacy in the control of *D. abbreviatus*.

Resumen

El uso de nemátodos entomopatógenos (NEP) para el control de insectos plaga en el suelo es una práctica común. El presente estudio tiene como objetivos, caracterizar las comunidades de NEP asociadas a los cítricos, caracterizar las especies de hongos con potencial antagónico de nemátodos asociadas a suelos de cítricos y evaluar la susceptibilidad de *Diaprepes abbreviatus* al nematodo nativo *Rhabditis* sp. y NEP introducidos *Steinerna glaseri* (Aislado NJ93) y *Heterorhabditis bacteriophora*. Se llevaron a cabo dos muestreos en cinco huertos de cítricos en las estaciones experimentales agrícolas de Isabela y Adjuntas. El primer muestreo fue realizado de septiembre a noviembre de 2007 y el segundo muestreo de abril a mayo de 2008. La extracción de nemátodos se realizó utilizando larvas de *Galleria mellonella*. Para aislar los hongos del suelo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} , de esta se sembró una alícuota de 1 ml en Agar Rosa de Bengala con Estreptomicina. Se contabilizaron las colonias de hongos y se expresaron como $\log_{10}$ ufc/g suelo seco. Para evaluar la susceptibilidad de *D. abbreviatus* a los NEP y a *Rhabditis* spp., se utilizaron larvas de este insecto y se inocularon con 10 IJ/cm² de suelo de cada una de las especies de nematodos en suelo estéril. Para los tratamientos combinados se utilizó la mitad de la dosis, como control se aplicó agua. Se evaluó la mortalidad a los 2, 5 y 10 días. En ninguno de los predios muestreados se observó la presencia de NEP, pero sí la presencia constante de un nemátodo del género *Rhabditis* (Rhabditoidea) en las larvas muertas. Los hongos aislados e identificados más frecuentemente fueron: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium catenulatum*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma viride* y *Verticillium* spp. No se observó interacción entre *Rhabditis* spp. y los NEPs. *H. bacteriophora* y *S. glaseri* (aislado NJ93). *H. bacteriophora* mostró mayor eficiencia en el control de *D. abbreviatus*.

Dedicatoria

A mis padres: Adalgisa M. Peña y Antonio E. García por ser la fuente de toda mi inspiración.

Agradecimientos

A Dios todo poderoso por guiar mis pasos a cada momento y permitirme vivir esta maravillosa experiencia.

A mis hermanos Arelis, Héctor Miguel, Warlin, Walter y Juan Carlos por su apoyo.

Al Centro Para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF), por la confianza que depositaron en mí al elegirme como participante en este programa de formación.

A la Secretaría de Estado de Agricultura (SEA) por el apoyo brindado.

A mi mentor y amigo Dr. José A. Chavarría Carvajal por permitirme formar parte de su proyecto de investigación.

A la Dra. Lydia I. Rivera, la Prof. Nydia E. Vicente y al Dr. David Jenkins por formar parte de mi comité graduado y tenerme siempre las puertas abiertas.

Al personal de las estaciones experimentales agrícolas de UPR localizadas en Isabela y Adjuntas, por su colaboración.

Al Departamento de Protección de Cultivos de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Mayagüez en especial al Prof. Arístides Armstrong, Sra. María Pagán, Sra. Jeannette Morales, Agro. Víctor González y Agro. Luis Collazo.

Al departamento de Biología en especial a María Méndez, Mary Jiménez, José Almodóvar y Donato Seguí por el apoyo brindado.

A Juan Darío Cruz y a Ivon Ventura, a la familia Avilés Vásquez y a Doña Mercedes por convertirse en una familia.

A todos mis amigos, en especial a Marcela Ospina, José Joaquín, Edy Jiménez, Edward Roa, Laura Polanco, Manuel Pérez y Alejandro Pujols por compartir conmigo este proceso de formación profesional.

Esta investigación fue financiada por el proyecto Z-TSTART-41: Habitat and Role of Natural Enemies in Regulating Spatial Patterns of Entomopathogenic Nematodes.

Tabla de Contenido

LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE APENDICES	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
CULTIVO DE CÍTRICOS	7
NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS	8
HONGOS NEMATÓFAGOS.....	11
IV. METODOLOGÍA	13
LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	13
FASE DE CAMPO	14
<i>Descripción de los predios muestreados</i>	14
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS	15
ESTIMACIÓN DE LAS POBLACIONES DE NEP	16
IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS	17
AISLAMIENTO DE POSIBLES HONGOS NEMATÓFAGOS	18
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	19
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	19
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	19
INTERACCIÓN ENTRE EL NEMATODO NATIVO <i>RHABDITIS</i> SPP. Y NEP INTRODUCIDOS PARA EL CONTROL DE LARVAS DE <i>DIAPREPES ABBREVIATUS</i>	21
V. RESULTADOS.....	23
CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEP	23
POBLACIONES DE POSIBLES HONGOS NEMATÓFAGOS	28
CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES HONGOS NEMATÓFAGOS.	29
SUSCEPTIBILIDAD RELATIVA DE LARVAS DE <i>DIAPREPES ABBREVIATUS</i>	38
VI. DISCUSIÓN.....	41
CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEP	41
CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE POSIBLES HONGOS NEMATÓFAGOS	43
INTERACCIÓN ENTRE <i>RHABDITIS</i> SP. NATIVO Y NEP INTRODUCIDOS PARA EL CONTROL DE <i>DIAPREPES ABBREVIATUS</i>	44
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. RECOMENDACIONES	47
IX. LITERATURA CITADA.....	48
X. APÉNDICES	56

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Descripción de los predios muestreados en Adjuntas	14
Cuadro 2. Descripción de los predios muestreados en Isabela	14
Cuadro 3. Por ciento de mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> por predios muestreados...	23
Cuadro 4. Estimación de la densidad poblacional de <i>Rhabditis</i> spp. (N) por metro cuadrado.....	27
Cuadro 5 . Niveles poblacionales de hongos en la rizósfera de cítricas de Adjuntas e Isabela. ...	28
Cuadro 6. Géneros de hongos identificados y número de aislados.....	29
Cuadro 7. Mortalidad de larvas de <i>Diaprepes abbreviatus</i> a los 2, 5, y 10 días después de la inoculación (n= 5).	38
Cuadro 8. Cadáveres de <i>Diaprepes abbreviatus</i> que mostraron nemátodos	40

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución mundial de la producción de cítricos en toneladas métricas (F. A. O. 2007).....	7
Figura 2. Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos. (1, 2) Invasión y colonización. (3,4) Desarrollo dentro del insecto (5) Salida del insecto muerto. Tomado de W.S. Cranshaw and R. Zimmerman (2001).	9
Figura 3. Mapa de Puerto Rico mostrando los municipios donde se encuentran localizadas las Estaciones Experimentales Agrícolas muestreadas. (A) Isabela (B) Adjuntas.....	133
Figura 4. Muestreo en campo. (A) Toma de muestras de suelo alrededor de la copa del árbol (B) Desinfección de la barrena con NaOCl 1.0%.	15
Figura 5. Extracción de nemátodos de suelo. (A) Tamizado de suelo (B) Frascos con suelo y larvas (C) Larvas de <i>Galleria mellonella</i> (D) Trampas White.	16
Figura 6. Inoculación de nemátodos a larvas de <i>Diaprepes abbreviatus</i> en suelo esterilizado....	22
Figura 7. Determinación de causante de mortalidad. (A) larva de <i>Diaprepes abbreviatus</i> muerta por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (B) 1 J1 <i>Rhabditis</i> spp. 2 J1 <i>Steinernema glaseri</i> (Aislado NJ93).....	22
Figura 8. Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> por localidad en cada muestreo.	24
Figura 9. <i>Rhabditis</i> spp. (A) Vista completa del cuerpo de nemátodo (B) Vista de la parte anterior mostrando el bulbo medio y el terminal.	25
Figura 10. Microscopía electrónica de rastreo de <i>Rhabditis</i> spp. (A) Abertura bucal o estoma (B) Parte posterior del cuerpo mostrando la abertura anal (C) Vulva localizada en la mitad del cuerpo.....	26
Figura 11. Población estimada de <i>Rhabditis</i> spp. por localidad en cada muestreo.	28
Figura 12. Poblaciones de hongos por localidad en cada muestreo.....	29
Figura 13. <i>Aspergillus</i> spp. (A) Colonia del aislado JM18 en PDA (B) Conidióforo y conidias del aislado JM18 (C) Colonia de <i>Aspergillus niger</i> en PDA (D) Conidióforo y conidias de <i>Aspergillus niger</i>	30
Figura 14. <i>Chaetomium globosum</i> (A) Colonia en PDA (B) Peritecios y conidias.....	31

Figura 15. <i>Fusarium</i> spp. (A) Colonia de <i>Fusarium solani</i> en PDA (B) Conidias de <i>Fusarium solani</i> (C) Colonia del <i>Fusarium oxysporum</i> en PDA (D) Conidias de <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Figura 16. <i>Gliocladium catenulatum</i> (A) Colonia en medio de cultivo PDA (B) Conidias y conidióforo.....	33
Figura 17. <i>Paecilomyces</i> spp. (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.	34
Figura 18. <i>Penicillium</i> spp. (A) Colonia del aislado JM2 en PDA (B) Conidióforo y conidias del aislado JM2 (C) Colonia del aislado JM6 en PDA (D) Conidióforo y conidias del aislado JM6.	35
Figura 19. <i>Trichoderma viride</i> (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.....	36
Figura 20. <i>Verticillium</i> spp. (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.	37
Figura 21. Mortalidad de larvas de <i>Diaprepes abbreviatus</i> a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación. (A) Mortalidad en el primer ensayo (B) Mortalidad en el segundo ensayo.....	39

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Secuencias editadas de la región ITS1 e ITS4 de 20 aislado.....	56
Apéndice 2. Datos primer muestreo de nemátodos entomopatógenos.....	67
Apéndice 3. Datos segundo muestreo de nemátodos entomopatógenos.....	68
Apéndice 4. Análisis de varianza de mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	69
Apéndice 5. Datos primer muestreo de hongos.....	70
Apéndice 6. Datos segundo muestreo de hongos.....	72
Apéndice 7. Análisis de varianza de la población de hongos.....	75
Apéndice 8. Mortalidad de larvas de <i>Diaprepes abbreviatus</i> , primer ensayo.....	73
Apéndice 9. Mortalidad de larvas de <i>Diaprepes abbreviatus</i> , segundo ensayo.....	74
Apéndice 10. Análisis de varianza de Interacción entre <i>Rhabditis</i> spp. nativo y NEP introducidos para el control de <i>Diaprepes abbreviatus</i>	78

I. Introducción

El cultivo de cítricos tiene un gran potencial agrícola y es uno de los frutos de mayor importancia económica en Puerto Rico. Según los datos del Censo Agrícola realizado en el 2002, en el país se cultivan cítricos comercialmente en diez municipios, donde sobresalen Lares, San Sebastián, Adjuntas, Utuado y Maricao, con una superficie cultivada de 3,100 hectáreas, (Censo de Agricultura, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2002). Para el año fiscal 2007-2008, la producción de cítricos fue de 130,500 millares a un costo promedio de US\$94.00 por millar, aportando \$11.0 millones al ingreso bruto agrícola del país, lo cual representó un 34% de un total de 32.6 millones (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008).

En Puerto Rico, el cultivo comercial de cítricos se realiza principalmente en las zonas montañosas de la isla. La mayor producción de cítricos en la Isla la representan las chinas dulces (*Citrus sinensis*), seguidas por el limón (*Citrus lemon*), toronjas (*Citrus paradissi*) y mandarinas (*Citrus reticulata*) (Toro, 1989). Estos frutos son utilizados como fuente de vitamina C, además de pequeñas cantidades de los complejos de vitaminas B y E. Actualmente, el consumo de cítricos es recomendado para ayudar a prevenir problemas circulatorios, algunos tipos de cáncer y enfermedades del sistema nervioso central ya que poseen componentes que fortalecen los vasos sanguíneos (Saunt, 1992).

Los insectos plagas del suelo, constituyen una de las mayores limitantes en los agroecosistemas a nivel mundial, generando bajos rendimientos y en muchos casos pérdidas de hasta el 100%. Los principales daños están relacionados con muerte de las semillas y plántulas, escaso desarrollo de las raíces y partes aéreas, alteraciones morfológicas y fisiológicas,

marchitez, debilitamiento, volcamiento, acceso de fitopatógenos directa e indirectamente y en muchos casos la muerte (Ríos y Parra, 1982).

La amenaza biótica más importante de la industria de cítricos en la Florida, EE.UU. y en muchos países del Caribe es *Diaprepes abbreviatus* ya que la larva subterránea se alimenta de las raíces fibrosas, siendo este daño, portal de infección para hongos patógenos, como son *Phytophthora nicotianae* y *P. palmivora*. Este complejo plaga-enfermedad debilita o mata el árbol (Graham et al., 2003), causando pérdidas anuales de \$75 millones (Lapointe et al., 1999; McCoy, 1999).

Las medidas mayormente empleadas para el control de ésta y otras plagas de suelo importantes para el cultivo de cítricos, se pueden reunir en dos grupos: control químico y control biológico (sin químicos). Las primeras incluyen tanto el uso de insecticidas como de otros químicos (i.e. atrayentes o repelentes) (Bosque, 1992). En la agricultura se utilizan aproximadamente 2.5 millones de kilogramos de insecticidas sintéticos de amplio espectro cada año, distribuidos en 900 ingredientes activos y más de 50,000 formulaciones comerciales (Pimentel et al., 1992). El porcentaje utilizado en países en desarrollo ha ascendido en las últimas 3 décadas de un 20% a cerca del 40% (Nieto, 2001). Este sorprendente incremento en el uso de insumos químicos, plantea una serie de interrogantes sobre sus efectos en el ambiente y la sustentabilidad (Njos, 1994). La continua aplicación de estos insecticidas ha provocado resistencia en las plagas (Morris et al., 1991). Encuestas realizadas en la Florida, EE.UU., mostraron que existen unas veinte y cinco especies de insectos catalogadas como plagas agrícolas que han desarrollado resistencia a insecticidas (Leibee y Capinera, 1995).

Dentro de las estrategias biológicas, se ha hecho énfasis en la búsqueda y evaluación de microorganismos entomopatógenos con el propósito de seleccionar aquellos con potencial para

ser desarrollados como bioinsecticidas e incluirlos en programas de manejo integrado (Toledo, 2002). Esta tendencia puede explicarse por el aumento de normas legislativas dirigidas a reducir el uso de plaguicidas, estrategia que brinda como alternativa el empleo de productos más amigables con el medio ambiente (Hominick y Collins, 1997).

Hasta hoy se han reconocido ocho familias de nemátodos parásitos de insectos, estas son: Allantonematidae, Diplogasteridae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerularidae, Tetradonematidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (Sáenz, 1999). Los géneros *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp, son los más utilizados. Sus larvas son aplicadas al suelo en el tercer estado juvenil. A diferencia de la mayoría de agentes biocontroladores que requieren varios días o semanas para matar a sus huéspedes, los nemátodos entomopatógenos (NEP) trabajando con sus bacterias simbióticas (*Xenorhabdus* spp. o *Photorhabdus* spp.), matan al insecto huésped en 24-48 horas (Salem, et. al., 2007). Estos NEP, localizan larvas subterráneas de insectos, penetran al hemocelo y liberan la bacteria simbiótica, ésta se multiplica y mata el hospedero por septicemia. Son los únicos patógenos de insectos con un amplio rango de hospederos y pueden ser reproducidos masivamente en medios sólidos o líquidos por lo que son ampliamente reconocidos como agentes de control biológico (Poinar, 1990, Downes y Griffin, 1996).

En América Latina desde hace 20 años, esta herramienta de control de insectos se considera con gran potencial para implementar diferentes programas de Manejo Integrado de Plagas (Georgis y Hom, 1992). Se han obtenido resultados prometedores en el campo del control biológico de *Cosmopolites sordidus* en cultivos de banano (Rosales y Suárez, 1998), *Diaprepes abbreviatus* y *Phyllophaga* spp. en caña de azúcar (Sirjusingh et al., 1992) y *Popillia japonica* en campos de golf (Grewal et al., 2002).

La tasa de mortalidad de larvas de *Diaprepes abbreviatus* en el campo por NEP es superior al 80% semanal durante los meses de verano (Duncan et al., 2003b). Este resultado es similar al obtenido por Bullock et al., (1999) al comparar durante un año el efecto de dos tratamientos al suelo de los nemátodos entomopatógenos *S. carpocapsae* y *S. riobrave* en huertos de cítricos en Florida, siendo la mortalidad de 89%.

En el suelo, la tercera etapa juvenil del NEP es vulnerable a una serie de condiciones bióticas y abióticas. Las condiciones abióticas como la humedad del suelo, temperatura y la textura pueden jugar un papel muy importante en la supervivencia de los NEP (Evans y Kaplan, 1990). Entre los factores bióticos los NEP se exponen a una amplia variedad de microorganismos antagónicos como bacterias y hongos. Los hongos nematófagos (HN) reprimen los nemátodos parásitos de plantas en suelos alrededor del mundo (Kerry, 1988). Estudios sobre la patogenicidad de once aislados de hongos a nemátodos fitoparásitos mostraron un nivel significativo de control sobre *Pratylenchus penetrans* (Timper y Brodie, 1993).

Los hongos nematófagos pueden reducir el número y la eficiencia biocontroladora de insectos plaga en los agro-ecosistemas de los NEP. Evaluaciones bajo condiciones de laboratorio para determinar el impacto del hongo nematófago *Hirsutella rhossiliensis* en la efectividad de *Steinernema carpocapsae*, *S. glaseri*, y *Heterorhabditis bacteriophora* en el control de larvas del gusano de la cera (*Galleria mellonella*), demostraron que la presencia de *H. rhossiliensis* interfirió con la habilidad de los nemátodos entomopatógenos para causar infección en las larvas del insecto (Timper y Kaya, 1992). Así mismo, *Arthrobotrys oligospora* y *Dactylaria* spp., en ensayos de laboratorio se mostraron efectivos como reguladores de poblaciones de nemátodos bacteriófagos (Rhabditidae, Cephalobidae) en la capa arable del suelo (Bouwman et. al 1996).

Sin embargo la literatura científica carece de información acerca de los efectos de los hongos antagonistas sobre los NEP y la reducción de su efectividad en el control de insectos plaga de importancia agrícola.

II. Objetivos

- 1- Caracterizar las comunidades de nemátodos entomopatógenos asociados a cultivos de cítricas de las Subestaciones Experimentales Agrícolas de Isabela y Adjuntas, Puerto Rico.
- 2- Estimar y caracterizar las especies de hongos con potencial antagonico de nemátodos asociados al suelo de huertos de cítricas en Isabela y Adjuntas, Puerto Rico.
- 3- Estudiar la susceptibilidad relativa de larvas de *Diaprepes abbreviatus* a la especie de nemátodo nativo *Rhabditoidea* y de los nemátodos entomopatógenos introducidos *Steinernema riobrave* (Aislado NJ93) y *Heterorhabditis bacteriophora*.

III. Revisión de Literatura

Cultivo de cítricos

Los cítricos se presentan como uno de los grupos de frutas más cultivados a nivel mundial (Saunt, 1992). La producción mundial, basados en la producción de naranjas (*Citrus sinensis*), toronjas (*Citrus paradissi*) y limones (*Citrus lemon*), según los datos de la F.A.O (siglas en inglés) en el 2007, fue de 74,246,820,000 TM, siendo Brasil, Estados Unidos y México los principales productores. A estos les siguen India, China, España e Irán (Figura 1) (F.A.O. 2007).

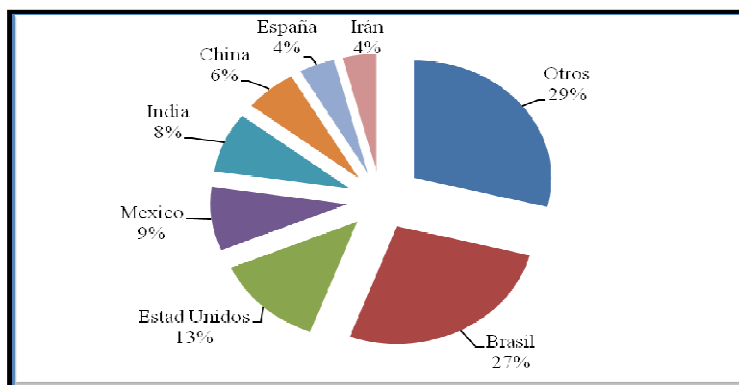


Figura 1. Distribución mundial de la producción de cítricos en toneladas métricas (F. A. O. 2007).

Los cítricos pertenecen a la familia *Rutacea* la cual comprende los géneros: *Poncirus*, *Fortunella* y *Citrus*. De estos el género *Citrus* es el de mayor importancia comercial y cuenta con 145 especies (Loussert, 1992). Los cítricos se cultivan desde hace 4.000 años, y se desarrollan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud N y S. El género *Citrus* proviene de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo. El lugar de origen de los cítricos se ubica en el sudeste de Asia, incluyendo el este de Arabia, el área oriental de Filipinas y desde el Himalaya hasta Indonesia (Forbel, 2006).

Nemátodos entomopatógenos

Dujardin en Francia describió al primer NEP *Mermis nigrescens*, 20 años después, Sir John Lubbock y Edinburg, presentaron información biológica y taxonómica sobre *Sphaerularia bombi* que amplió las perspectivas contemporáneas en la naturaleza de las asociaciones de nemátodo-insecto (Webster, 1980). Durante la primera mitad del siglo XX Cobb en los Estados Unidos, Filipjev en Rusia, Steiner en Alemania y Bovien en Dinamarca realizaron contribuciones significativas en la taxonomía de los NEP (Webster, 1980). Después de los avances de Cobb en 1927 y la publicación de Tom Goodey sobre la biología y taxonomía del nemátodo *Tylenchinema oscinellae* como parásito del insecto *Oscinella frit* L. el interés en el tema disminuyó por 20 años (Webster, 1980). Una excepción a esta generalización fue el trabajo de Glasser y sus colaboradores en Nueva Jersey para el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, los cuales persiguieron una línea de investigación con Rhabditidos, nemátodos del género *Neoaplectana* (Webster, 1980).

Actualmente, existen más de 90 empresas que producen y/o distribuyen nemátodos para el control de insectos que afectan la agricultura, la medicina y la veterinaria. Los países con mayor producción y distribución son Estados Unidos con el 68% del total de empresas, seguido por Canadá e Inglaterra con 10% y 3%, respectivamente. En Latinoamérica se destacan Costa Rica, Chile, Cuba, Brasil, Bolivia y México; en Europa, Alemania, Dinamarca, Holanda, Italia, República Checa, Suiza y Suecia; en Asia, Japón (no se incluyen registros de India y China), y Australia (Grewal et. al, 2004).

El Phylum Nematoda (=Nemata), luego de los Artrópodos, es uno de los más diversos del Reino Animal. Se encuentran en ambientes tan contrastantes y hostiles, como tundras y desiertos, desde aguas congeladas a aguas termales, ambientes marinos y de agua dulce, entre otros. Esta

amplia diversidad de hábitat, les permite relacionarse con otros organismos como los insectos (Kaya et al., 1993). Entre los insectos y los nemátodos, existen más de 3,000 relaciones naturales clasificadas desde forénsis, parasitismo, patogénesis, entre otras (Poinar, 1990; Gaugler, 1981). De las relaciones existentes en la naturaleza entre insectos y nemátodos, la patogénica es característica de una alta especialización debido a que estos nemátodos han desarrollado la capacidad de transportar e introducir una bacteria simbiote a la cavidad del cuerpo de los insectos (hemócelo). Los mismos tienen una asociación mutualista con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, los Steinernematidos están asociados con *Xenorhabdus* spp. y los Heterorhabditidos con *Photorhabdus* sp. (Boemare et al., 1993). El nemátodo, se alimenta de la bacteria y tejidos del hospedero muerto, completando su ciclo de vida, produciendo dos a tres nuevas generaciones. Cuando las sustancias nutritivas del huésped se agotan el NEP detiene su desarrollo en el tercer estado juvenil, emergen del cadáver y buscan una nueva presa (Figura 2). La evidencia filogenética sugiere que probablemente los NEP evolucionaron de un estado trófico de un nemátodo bacteriófago de vida libre a uno bacteriófago parasítico (Blaxter et al., 1998).

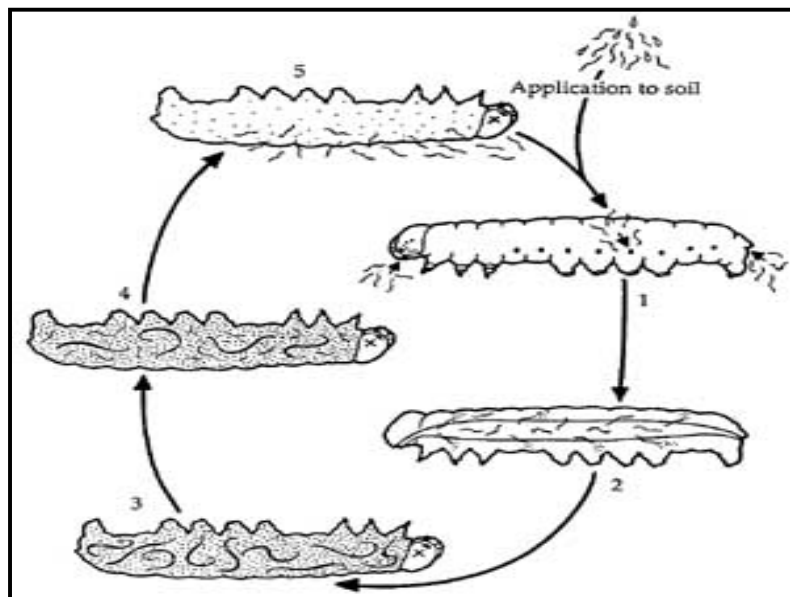


Figura 2. Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos. (1, 2) Invasión y colonización. (3,4) Desarrollo dentro del insecto (5) Salida del insecto muerto. Tomado de W.S. Cranshaw and R. Zimmerman (2001).

Se ha demostrado la presencia de NEP en todos los continentes, exceptuando la Antártida (Hominick, 2002). La mayoría de las especies de entomopatógenos se encuentran dentro de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Woodring y Kaya, 1988; Wright y Patel, 1996). Varias especies pertenecientes al grupo *Rhabditis*–Insectívora, han sido encontradas en asociación con invertebrados muertos en el suelo, en esta asociación, el infectivo penetra los hospederos por sus aperturas naturales, pero nunca se desarrollan los adultos hasta que el hospedero muere y el cadáver es invadido por bacterias (Sudhaus y Shulte, 1989).

Los NEP y sus bacterias simbióticas, a diferencia de otros patógenos de insectos, son inocuos a mamíferos, plantas y entomofauna benéfica (Gaugler y Boush, 1978; Gaugler, 1978; Akhurst, 1990). Estos nemátodos son parásitos obligados de insectos que eliminan a sus huéspedes con la ayuda de la bacteria que llevan en el intestino (Shapiro-Ilan et al., 2002). La relación existente entre el nemátodo y la bacteria es considerada como mutualista ya que la bacteria no puede penetrar al interior del insecto hospedero sin el nemátodo y los nemátodos no pueden crecer y reproducirse en ausencia de la bacteria (Georgis y Poinar, 1994).

La mayor parte de las etapas del ciclo de vida de los NEP ocurren en el interior del insecto huésped, excepto en la tercera etapa juvenil infectiva que ocurre en el suelo (Timper y Kaya, 1992). En esta tercera etapa los nemátodos son de vida libre, no se alimentan, son móviles y poseen quimiorreceptores que les ayudan a localizar su presa (Kaya y Gaugler, 1993). Durante esta etapa, buscan y penetran el insecto huésped a través de aberturas naturales (ej. boca, ano) y una vez dentro liberan la bacteria simbiótica (Poinar, 1990; Akhurst y Boemare, 1990; Timper y Kaya, 1992). Esta actividad mata al huésped entre 24 y 48 horas después de la infección (Shapiro-Ilan et al., 2002; Gaugler y Han, 2002). Los NEP presentan diferentes

comportamientos para infectar a sus insectos hospederos. Algunas especies se detienen y esperan, a estos se les ha llamado acechadores y otras especies buscan activamente y se han referido como cazadores (Kaya y Gaugler, 1993; Lewis et al., 1993).

Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos son los depredadores más conocidos de nemátodos, y debido a su alimentación casi completa de nemátodos apenas promueven el crecimiento de otros microorganismos (Barron, 1977). Los hongos antagónicos de los nemátodos incluyen una gran variedad de organismos pertenecientes a órdenes y familias ampliamente divergentes que incluyen endoparásitos, parásitos de huevos de nemátodos, parásitos de los quistes de los nemátodos, hongos capaces de producir metabolitos tóxicos para los nemátodos, y hongos que interceptan nemátodos (Mankau, 1980; Kaya y Koppenhofer, 1996).

Por su modo de acción, estos hongos se pueden agrupar en dos grupos principales: saprofíticos y parasíticos. Los saprofíticos incluyen formadores de redes tridimensionales pegajosas y formación de trampas no espontáneas (Wang et al., 2003). El grupo parasítico consiste en formadores de protuberancias adhesivas, ramas adhesivas y anillos atrapadores (Ahren y Tunlid, 2003).

Los hongos nematófagos son generalmente parásitos facultativos y tienen la capacidad de infectar huevos y juveniles (Jansson y López-Llorca, 2004). Pueden sobrevivir y proliferar en la rizosfera (De Leij y Kerry, 1991). Además son capaces de colonizar tejidos de la corteza y epidermis de las raíces de la planta (Bordallo et al., 2002). Los hongos nematófagos en su ambiente natural pueden funcionar mejor como antagonistas (Monfort et al., 2006).

El grupo de hongos que interceptan nemátodos consiste de Hyphomycetos que viven en el suelo, capturan nemátodos usando estructuras especializadas llamadas trampas. Estas trampas

se pueden clasificar morfológicamente en cuatro categorías: redes adhesivas, protuberancias adhesivas, ramas adhesivas y anillos constrictores (Ahren y Tunlid, 2003). Los hongos interceptores de nemátodos son más abundantes en la rizósfera que en el suelo libre de raíces (Wang et al., 2003). El mayor interés en estudiar los hongos que interceptan nemátodos viene de su potencial como agentes de control biológico de nemátodos parásitos de plantas (Kerry, 2000; Ahren y Tunlid, 2003).

IV. Materiales y Métodos.

Localización del estudio

El estudio se realizó en las Estaciones Experimentales Agrícolas (EEA) de Isabela y Adjuntas, del Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto de Mayagüez, de la Universidad de Puerto Rico. La EEA de Isabela se encuentra localizada al noroeste de Puerto Rico, carretera # 2, Km 114.7, Barrio Guerrero, a una altitud de 128 m.s.n.m, geográficamente se encuentra en la Latitud N 18°27'732", Longitud W 067°03'355". La estación comprende 122 hectáreas. La precipitación promedio anual es de 2,032 mm, siendo el mes más húmedo mayo y el más seco febrero. La temperatura promedio anual oscila entre 22.2 y 27.8 °C. El suelo predominante pertenece al orden Oxisol, serie Coto (típico suelo Eutruxox) (Figura 2).

La EEA de Adjuntas está localizada en la parte centro oeste de la isla, carretera #525, KM 2.5, Barrio Limaní. Se encuentra a una elevación de 594.4 m.s.n.m, se encuentra en la Latitud N 18°10'474", Longitud W 066°47'961". La estación comprende unas 74 hectáreas y registra una pluviometría media anual de 2,540 mm. La época lluviosa se concentra en los meses de mayo, agosto, septiembre y octubre, y la época seca se registra en los meses de diciembre, febrero, marzo y junio. La temperatura promedio alta anual oscila entre 18.3 y 28.9 °C. Las series de suelos más abundantes son Alonso, Daguey, Humatas, Limaní y Morado (Estación Experimental Agrícola 2002-2003) (Figura 3).

Fase de campo

Se seleccionaron cinco huertos de cítricos, ya establecidos, localizados en la estación experimental agrícola de Isabela y la misma cantidad en Adjuntas. Los huertos seleccionados fueron: china dulce (*Citrus sinensis*) cvs. Valencia y Nebo, mandarinas (*Citrus reticulata*) cv. Dancy, toronja (*Citrus paradissi*) cv. Marsh Seedless y un predio de chironja en Adjuntas, que es una combinación de china (*C. sinensis*) y toronja (*C. paradissi*) (Moscoso, 1958) (Cuadros 1 y 2). En cada uno de estos huertos se seleccionaron 3 hileras de árboles, dejando las de los bordes y de cada hilera se seleccionaron 5 árboles.

Descripción de los predios muestreados

Cuadro 1. Descripción de los predios muestreados en Adjuntas

	Cultivar	Año de Siembra	Hectáreas	Patrones
1	China (colección)	2003	0.79	Cleopatra
2	Toronja	2003	0.59	Limón, Cleopatra y China del País
3	Mandarina	1976	0.39	Cleopatra y Naranja
4	China	2002	1.57	Veneke, Carrizo y Sun Chu Sha
5	Chironja	2003	0.59	Swingle Citromelo y Veneke

Cuadro 2. Descripción de los predios muestreados en Isabela

	Cultivar	Año de Siembra	Hectáreas	Patrones
1	China (colección)	1999	1.56	Cleopatra
2	China (nueva)	2001	0.13	Cleopatra
3	Mandarina	2004	0.13	Swingle Citromelo, Carrizo, HR812, Cleopatra y Sun Chu Sha
4	China (Valencia)	1999	0.19	Valencia
5	China	1993	0.19	Cleopatra

Se tomaron muestras compuestas de suelo, con la ayuda de una barrena, alrededor de la copa del árbol entre 25 y 30 cm. de profundidad (Figura 4 A). Estas muestras se llevaron al laboratorio en bolsas plásticas. La barrena utilizada para tomar las muestras fue desinfectada con 1.0% NaOCl por un minuto, antes de pasar de una hilera a otra (Figura 4 B). En cada localidad

se realizaron dos muestreos, el primero del 13 de Septiembre al 8 de noviembre 2007 y el segundo del 10 de abril al 1 de mayo 2008.



Figura 4. Muestreo en campo. (A) Toma de muestras de suelo alrededor de la copa del árbol (B) Desinfección de la barrena con NaOCl 1.0%.

Aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos

Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo se pasaron por tamices (número 8) para homogenizar el suelo y eliminar segmentos de raíces y piedras (Figura 5 A). Estos tamices fueron lavados con agua y jabón, esterilizados con alcohol y calentados en un horno (90 y 100 °C) durante 5 minutos entre cada muestra para evitar contaminación. Se llenaron 5 frascos, debidamente identificados, con suelo de cada hilera (Figura 5 B) y se añadieron en cada uno 5 larvas del gusano de la cera (*Galleria mellonella* L.). El cuarto instar de este insecto, provee una excelente detección de nemátodos en el campo o en muestras procesadas en laboratorio (Bedding y Akhurst, 1975) (Figura 5 C). Estas larvas fueron adquiridas comercialmente y se establecieron colonias, con la finalidad de contar con larvas durante todas las épocas de muestreo (Apéndice

1). A los 7 días se extrajeron las larvas cuidadosamente y se determinó el porcentaje de mortandad.

La extracción de nemátodos de las larvas muertas se realizó siguiendo la metodología de trampas White (White 1927) que consiste en colocar los cadáveres del insecto en placas Petri con solución Ringer (Apéndice 2), sobre un papel de filtro (Figura 5 D). A los 7 días se contabilizaron los nemátodos extraídos de las larvas utilizando un estereoscopio (Fisher Scientific, Spt-ITH, Pittsburgh, PA) y una placa de conteo. Los nemátodos colectados se guardaron en frascos en la nevera.

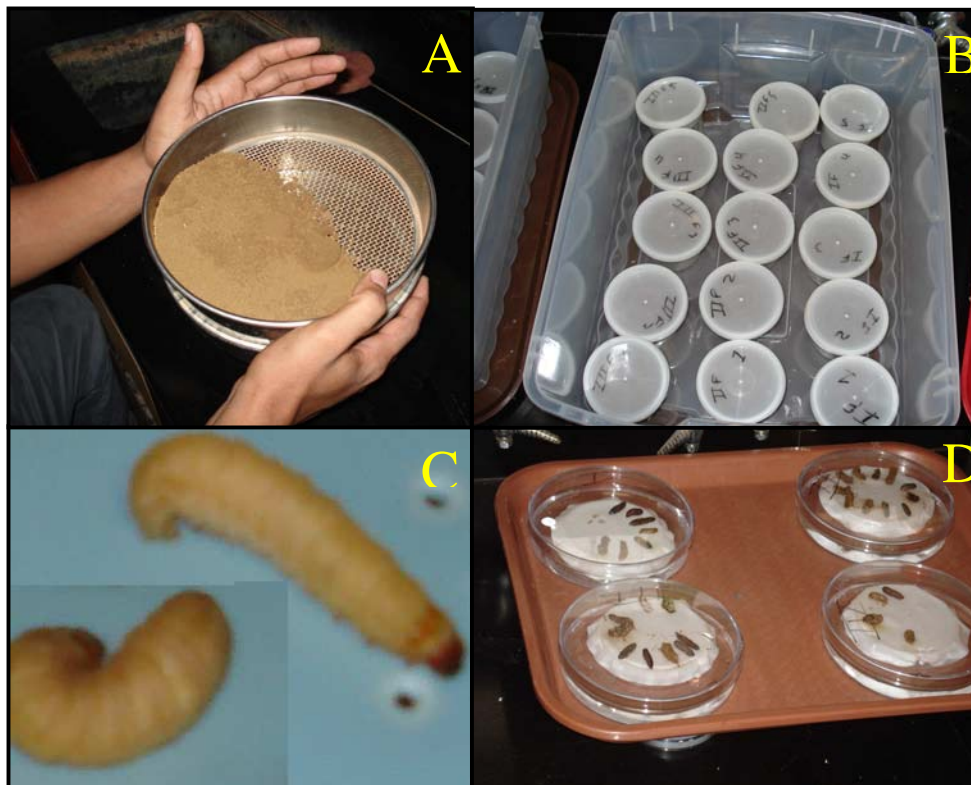


Figura 5. Extracción de nemátodos de suelo. (A) Tamizado de suelo (B) Frascos con suelo y larvas (C) Larvas de *Galleria mellonella* (D) Trampas White.

Estimación de las poblaciones de NEP

Para estimar la población de NEP en los predios se utilizó la fórmula propuesta por Bednarek y Nowicki en 1991:

$$N = 2 \frac{P}{M\pi r^2} \sum_{k=1}^n I_k$$

P= Área en M donde se tomaron las muestras (se recomiendan 5,000 m²)

n= Número de larvas de *Galleria* utilizadas (75)

I_k= Número de nemátodos recuperados en 5 larvas de *Galleria*

M= Número de muestras que fueron tomadas (se recomienda 50 por 5,000 m²)

r= Radio de la barrena utilizada (1.5cm).

Identificación de nemátodos

Para la identificación de los nemátodos se inocularon 5 larvas del gusano de la cera en 3 ocasiones, una muestra de estas tres generaciones, se fijó en formalina al 1% y se envió a Larry W. Duncan en la Universidad de la Florida (Lake Alfred, Experimental Station Road). En adición se montaron especímenes de nemátodos en laminillas con lactofenol para observar la morfología, bajo el microscopio (Olympus U-TV1X-2, Japón) y se tomaron fotografías de las estructuras observadas con una cámara PaxCam modelo PS-CM utilizando el programa PAX – IT (versión 6.7a).

Se tomó una muestra del nemátodo Rhabditido y se realizó microscopia electrónica de rastreo para corroborar la identificación. Esto se realizó siguiendo la metodología del Laboratorio de Microscopia Electrónica del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Mayagüez, para lo cual se tomó una muestra del nemátodo y se fijó por 24 a 4⁰ C horas en glutaldeido al 4% en amortiguador de fosfato al 0.1% (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) con un pH de 7.2. Luego se realizaron tres lavados con un amortiguador de fosfato, 0.1% M (pH 7.2), por 15 minutos cada uno. La muestra se centrifugó (Eppendorf 545) a 1000 rpm para eliminar el buffer.

La deshidratación del nemátodo se realizó, cambiando la muestra cada 15 minutos a etanol en concentraciones de 5 hasta 100% con incrementos de 5%. Finalmente se realizaron dos inmersiones en etanol al 100%. Luego de deshidratada la muestra, se realizó el secado crítico (critical point drying). La muestra se montó sobre una base de aluminio (10 mm de diámetro) con una cinta de carbón y se le aplicó una cubierta de oro (EMS 550X Electron Microscopy Siences, Washington, PA). Para observar las muestras y tomar las fotos se utilizó un microscopio electrónico de rastreo modelo JEO-L5410 LV (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Aislamiento de posibles hongos nematófagos

Se pesaron 10g de la muestra de suelo y se añadieron a un matraz con 90 ml de amortiguador de fosfato de potasio (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) el cual mantiene un pH de 6.8 favorable para las poblaciones de hongos en el suelo. El matraz se colocó por 20 minutos en un agitador orbital (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Utilizando pipetas Pasteur, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} , agitando por un minuto en un Vortex entre una dilución y otra. Con la ayuda de una micropipeta serial ajustable (Eppendorf Reference), se colocó una alícuota de 100 μ L de la dilución 10^{-3} , en placas Petri con agar rosa de bengala con estreptomicina (ARBS), y se dispersó sobre la superficie del medio con la ayuda de un esparcidor de células y un plato giratorio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

Cada dilución se replicó cinco veces y se utilizaron controles con agua destilada estéril para comparar los resultados al final de cada prueba. Las placas se incubaron de cinco a siete días a 28 °C. Las colonias de hongos fueron contadas manualmente y se expresaron como $\log_{10}$ cfu/g de suelo seco. Para la separación de medias se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT, versión 2008. Luego se seleccionaron los tres hongos más comunes de todas las réplicas y éstos se transfirieron individualmente a placas Petri con agar de papa y dextrosa (PDA) (Difco,

Detroit, MI). Las placas se incubaron a 28 °C hasta que el hongo cubrió el plato Petri. Se prepararon cuñas con PDA para preservar los hongos. Estas cuñas se incubaron a 28°C por espacio de cinco a diez días y posteriormente se mantuvieron refrigeradas a 5 °C hasta su identificación.

Identificación de Hongos

Identificación morfológica

La identificación de los hongos se realizó utilizando las características morfológicas, para lo cual se prepararon laminillas con lactofenol y se observaron bajo el microscopio compuesto (Olympus U-TV1X-2, Japón). Se tomaron fotografías de las estructuras de reproducción observadas con una cámara PaxCam modelo PS-CM utilizando el programa PAX – IT (Versión 6.7^a). Para la identificación de los hongos se utilizaron diversas claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998; Hanlin et al., 1990; Leslie et al., 2006). Se describieron las colonias de acuerdo a la coloración en el medio de cultivo APDA.

Identificación molecular

Se extrajo el ADN genómico de fragmentos de las colonias de los aislados puros, siguiendo las indicaciones del fabricante del DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, California, USA) (Apéndice 3). El DNA extraído se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificó de la región ITS del ADN ribosomal, utilizando los iniciadores ITS 1 (5'- TCC GTA GGT GAA CTT GCG G-3) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) en un volumen de reacción de 20 µl que contenía 10 µl de mezcla maestra (REDExtract-N Amp, Sigma, St. Louis, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, 3 µl de cada iniciador (20 pmol) y 4 µl de ADN (5-50 ng).

El PCR se realizó utilizando un termociclador (Modelo T 3000, Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen) y consistió en una desnaturalización inicial del ADN por 1 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 55 °C por 30 segundos (hibridación), 72 °C por un minuto para la extensión y un ciclo final de extensión a 72 °C por 6 minutos. Una vez concluido el PCR, el producto fue almacenado en el congelador a – 20 °C (Fernández, 2005).

Para visualizar el resultado del PCR se utilizó gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1.0%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V durante 40 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón).

Los productos de amplificación del PCR se enviaron a las facilidades de Secuenciación y Genotipificación de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Río Piedras (Sequencing and Genotyping facility, University of Puerto Rico-Río Piedras) (www.mcc.com.pr), para su purificación y secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal.

Las secuencias de los diferentes aislados se editaron y alinearon utilizando el programa Vector NTI Advance 11. Una vez alineadas, las secuencias se introdujeron a la base de datos existente en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) y se obtuvo la especie con mayor porcentaje de similitud. El programa utilizado para tales fines fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Interacción entre el nemátodo nativo *Rhabditis* spp. y NEP introducidos para el control de larvas de *Diaprepes abbreviatus*

Se utilizaron envases de plástico (1000 ml de capacidad) se llenaron con 400 g de suelo de la serie Coto del orden Oxisol, de la Estación Experimental Agrícola USDA-ARS en Isabela, PR. El suelo fue esterilizado utilizando un autoclave por 2 horas a 121C° y 15 libras de presión. Se añadieron 75 ml de agua para llevar el suelo a capacidad de campo (18%), según lo indicado por el laboratorio de química de suelos de USDA-ARS-TARS en Mayagüez, PR.

Se colocaron en el suelo 10 larvas del último instar de *D. abbreviatus*, obtenidas de la División de Planta e Industria de Florida E.U. Los tratamientos utilizados fueron:

1- Control (2 ml de agua), 2 - *S. glaseri* (Aislado NJ93) (10 infectivos juveniles (IJ) por cm²), 3- *H. bacteriophora* (10 IJs por cm²), 4- *Rhabditis* spp. (10 IJs por cm²), 5- *Rhabditis* spp. combinado con *H. bacteriophora* (5 IJs cada uno), 6- *Rhabditis* spp. combinado con *S. glaseri* (Aislado NJ93) (5 IJs cada uno).

Los nemátodos introducidos *S. glaseri* (Aislado NJ93) y *H. bacteriophora* se obtuvieron del Dr. David Shapiro-Ilan de Southeastern Fruit and Tree Nut Research Laboratory in Byron, GA y *Rhabditis* spp. (nemátodo nativo) se obtuvo de los huertos de cítricas en las Estaciones Experimentales Agrícolas de Isabela y Adjuntas, P. R. Los tratamientos se aplicaron con agua utilizando una pipeta de 1 ml (Figura 6). La mortalidad de las larvas se registró a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación y los cadáveres de *D. abbreviatus* se colocaron individualmente en trampas White (White 1927) para obtener e identificar los nemátodos que causaron muerte a la larva.



Figura 6. Inoculación nematodos a larvas de *Diaprepes abbreviatus* en suelo esterilizado.

Para identificar el agente causante de la muerte de las larvas de *D. abbreviatus* en los tratamientos combinados se tomó en consideración que las larvas muertas por *Heterorhabditis* spp. toman un color rojo (Figura 7 A) y las muertas por *Rhabditis* spp. se tornan negras. En el caso de *S. glaseri*, los J1 son visiblemente más grandes que los *Rhabditis* spp. (Figura 7 B). Cada tratamiento se repitió 5 veces y el experimento se realizó dos veces. Para la separación de medias (PROC GLM) se utilizó el procedimiento de Student-Newman-Keuls (SNK) (SAS 2003). Para los análisis estadísticos los datos se transformaron en arco seno.

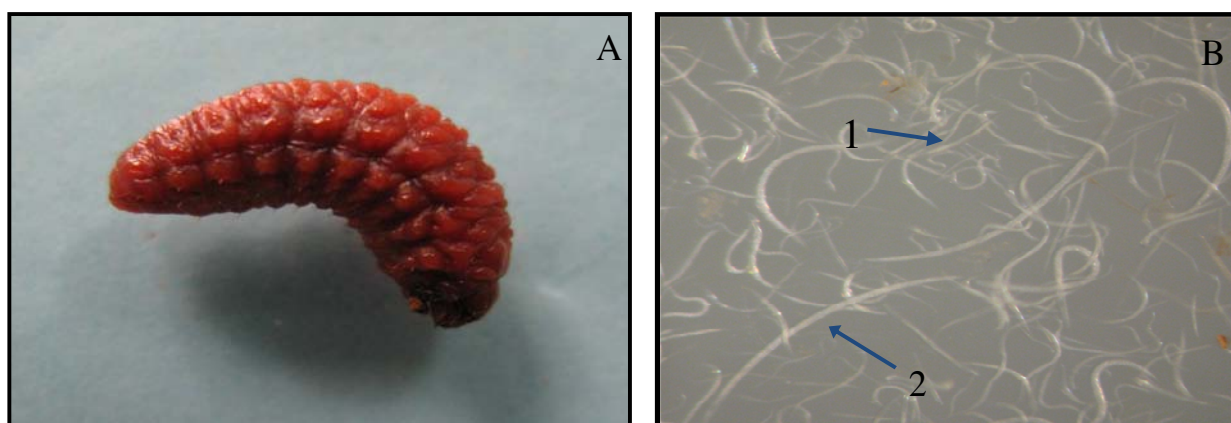


Figura 7. Determinación de causante de mortalidad. (A) Larva de *Diaprepes abbreviatus* muerta por *Heterorhabditis bacteriophora* (B) 1. J1 *Rhabditis* spp. 2. J1 *Steinernema glaseri* (Aislado NJ93)

V. Resultados

Caracterización de Poblaciones de NEP

Se observó mortalidad en larvas de *G. mellonella* en todos los predios muestreados no encontrándose diferencias significativas entre éstos (p-valor 0.0854). La mayor mortalidad en el primer muestreo se obtuvo en el predio de toronjas en Isabela y en el segundo muestreo en el predio de mandarinas en Adjuntas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Por ciento de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por predios muestreados.

Localidad	Predios	% Mortalidad	
		Primer Muestreo	Segundo Muestreo
Adjuntas	Chinas (Colección)	28.00	14.66
	Toronja	50.60	13.33
	Mandarina	40.00	17.33
	Chinas	34.60	10.66
	Chironja	44.00	20.00
Isabela	China (Colección)	12.00	17.33
	China (Nueva)	22.66	18.66
	Mandarina	22.66	22.66
	China (Valencia)	22.66	18.66
	China	40.00	16.00

% basado en 75 larvas por muestreo.

Para el primer muestreo la localidad de Adjuntas mostró una mortalidad menor que Isabela, contrario a lo que ocurrió el segundo muestreo. En ambas localidades se encontró una mortalidad mayor de larvas durante el primer muestreo (Figura 8).

No se observó la presencia de NEP de las familias Steinernematidae o Heterorhabditidae en los predios muestreados, pero se observó la presencia constante en las larvas muertas de un nemátodo nativo que según la determinación de Larry W. Duncan de la Universidad de Florida (Lake Alfred Experimental Station Road) pertenece al género *Rhabditis* (Rhabditoidea). Este nemátodo presenta una longitud de 1.24 mm (Figura 9 A), el esófago tiene dos bulbos, uno elongado (bulbo medio) y otro redondeado (bulbo terminal) (Figura 9 B).

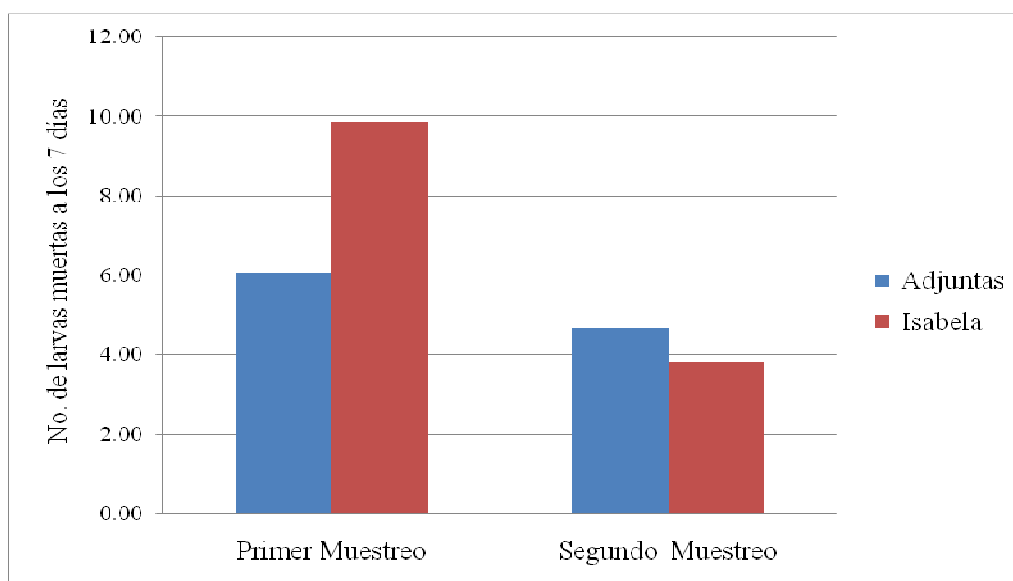


Figura 8. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por localidad en cada muestreo.

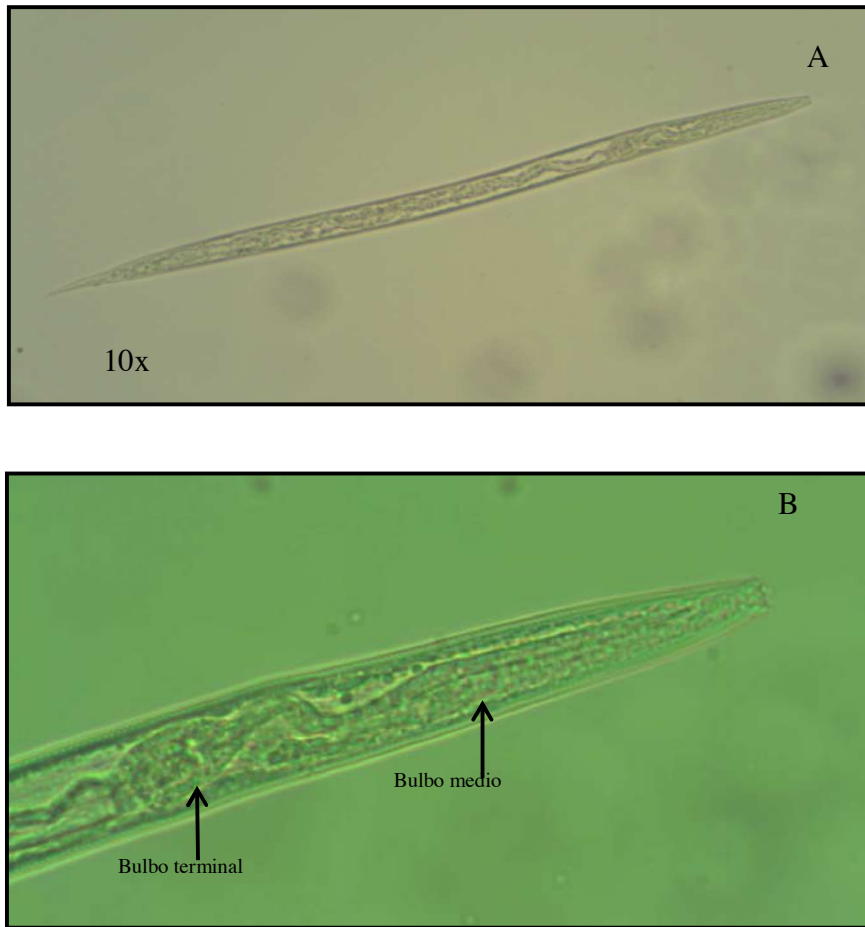


Figura 9. *Rhabditis* spp. (A) Vista completa del cuerpo de nemátodo (B) Vista de la parte anterior mostrando el bulbo medio y el terminal.

La abertura bucal o estoma es de tipo rhabditoide, no presenta estilete caudal, sedas o papilas (Figura 10 A). Estos individuos se caracterizan por que su cuerpo es más angosto en los extremos (Figura 10 B). La vulva está localizada cercana a la mitad del cuerpo (Figura 10 C).

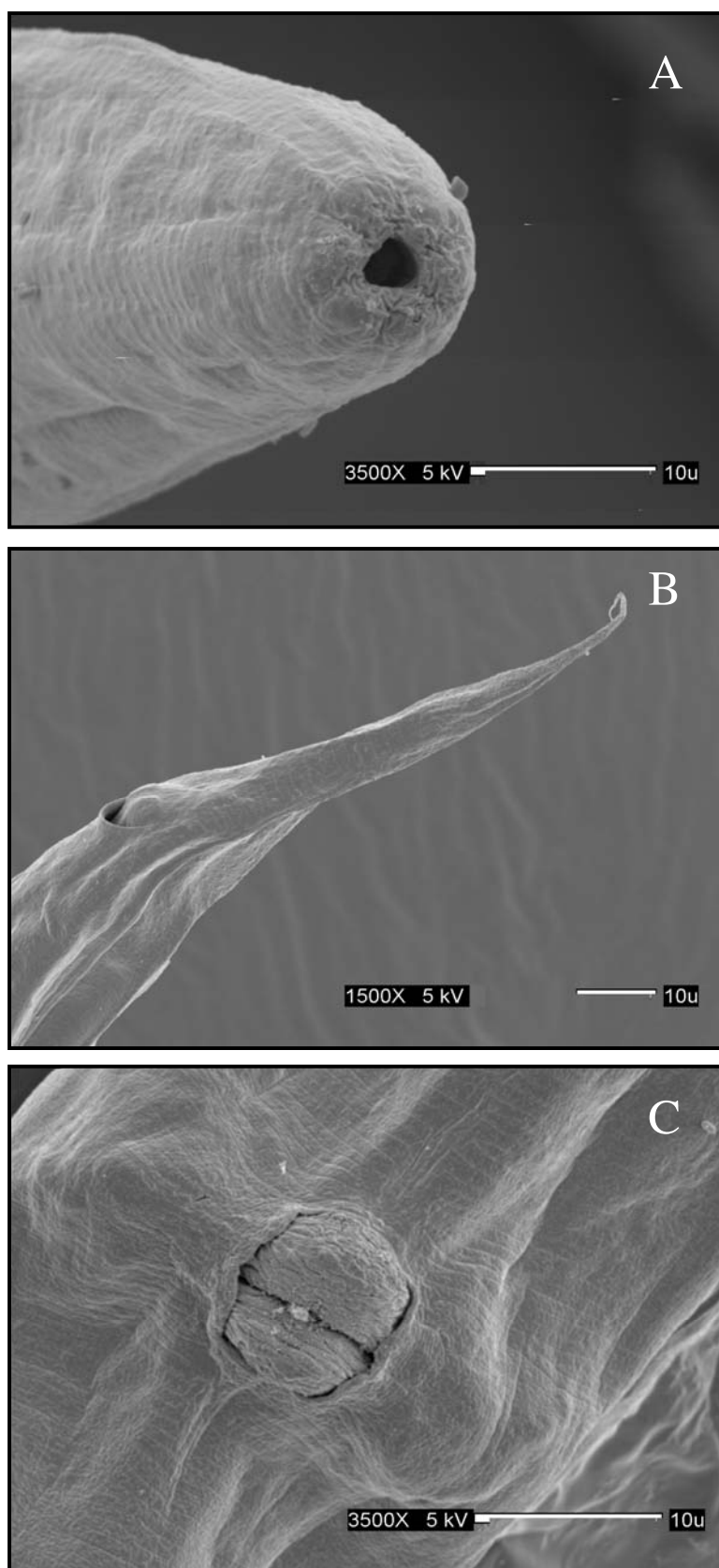


Figura 10. Microscopia electrónica de rastreo de *Rhabditis* spp. (A) Abertura bucal o estoma (B) Parte posterior del cuerpo mostrando la abertura anal (C) Vulva localizada en la mitad del cuerpo.

Se estimaron las poblaciones de *Rhabditis* spp. por metro cuadrado para todos los predios muestreados. La mayor densidad poblacional se encontró en Adjuntas durante el primer muestreo, siendo el predio de chinas el de mayor densidad y el de menor densidad fue el predio de toronjas. Esta observación se repitió durante el segundo muestreo, donde nuevamente el predio de chinas mostró la densidad más alta, mientras que en el de mandarinas fue la menor. En la localidad de Isabela el predio de chinas de la colección mostró mayor densidad poblacional de *Rhabditis* spp., mientras que el de mandarina mostró la menor densidad para ambas fechas de muestreo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estimación de la densidad poblacional de *Rhabditis* spp. (N) por metro cuadrado.

Localidad	Predios	P	Primer Muestreo		Segundo Muestreo	
			ΣI_k	N	ΣI_k	N
Adjuntas	China (Colección)	7900	14557	13548153.66	14968	13930670.06
	Toronja	5900	5660	3934137.94	19848	13795895.73
	Mandarina	3900	8839	4061148.60	19637	9022375.29
	China	15700	9775	18079963.90	20758	38394259.91
	Chironja	5900	7814	5431334.61	18597	12926353.94
Isabela	China (Colección)	15600	23017	42301372.30	12414	22814842.76
	China (Nueva)	1300	22317	3417907.51	22616	3463700.15
	Mandarina	1300	21229	3251277.43	18666	2858747.21
	China (Valencia)	1900	22396	5013086.52	16482	3689305.77
	China	1900	20576	4605700.49	8822	1974703.04

P = Área en m²

I_k = Número de nemátodos recuperados en 5 larvas de *Galleria mellonella*.

Según este estimado, en el primer muestreo la localidad de Adjuntas mostró una menor densidad poblacional de *Rhabditis* spp. en comparación al de Isabela, contrario a lo que ocurrió el segundo muestreo. En Adjuntas las poblaciones de nemátodos fueron mayores en el segundo muestreo, lo contrario se observó en Isabela. (Figura 11).

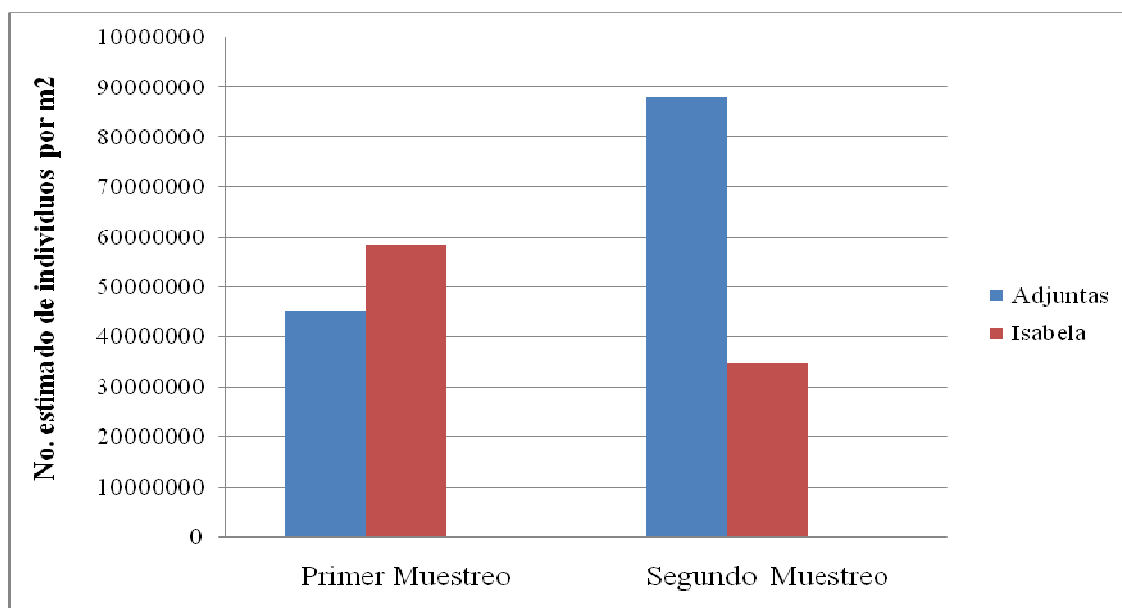


Figura 11. Población estimada de *Rhabditis* spp. por localidad en cada muestreo.

Poblaciones de posibles hongos nematófagos

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de unidades formadoras de colonias por localidades (p-valor 0.0164) observándose en Adjuntas las poblaciones más altas. Las poblaciones de hongos no fueron significativamente diferentes entre ambos muestreos (Cuadro 5).

Cuadro 5 . Niveles poblacionales de hongos en la rizósfera de cítricos de Adjuntas e Isabela.

Localidad	Predios	Primer Muestreo	Segundo Muestreo
Adjuntas	China (Colección)	1.0211	1.0149
	Toronja	1.0175	1.0147
	Mandarina	1.0174	1.0134
	Chinas	1.0167	1.0157
	Chironja	1.0180	1.0162
Isabela	China (Colección)	1.0122	1.0174
	China (Nueva)	1.0141	1.0158
	Mandarina	1.0113	1.0127
	China (Valencia)	1.0219	1.0162
	China	1.0113	1.0118
Medias de ufc/gr de suelo seco, basados en tres repeticiones por predio			

La población más alta de hongos se encontró en Adjuntas en ambas fechas de muestreo, siendo mayor durante la primera fecha de muestreo. En Isabela la mayor población de hongos se encontró durante el segundo muestreo (Figura 12).

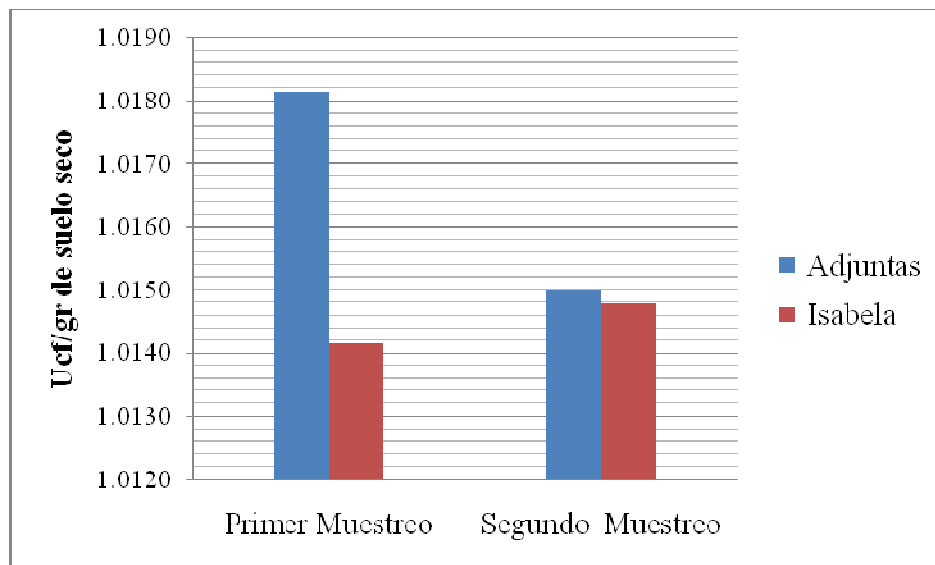


Figura 12. Poblaciones de hongos por localidad en cada muestreo.

Caracterización de posibles hongos nematófagos.

Se aislaron un total de 90 colonias por cada muestreo, para un total de 180. Se identificaron 8 géneros de hongos distribuidos en todos los predios muestreados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Géneros de hongos identificados y número de aislados.

Géneros	No. Aislados
<i>Aspergillus</i>	3
<i>Chaetomium</i>	2
<i>Fusarium</i>	4
<i>Gliocladium</i>	3
<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Penicillium</i>	2
<i>Trichoderma</i>	6
<i>Verticillium</i>	4
No identificados	12

***Aspergillus* spp.** Las colonias mostraron una coloración verdosa a negra en PDA, el aislado JM18 mostró conídias con ornamento y conidióforo hialino con pocos fiálidos. El aislado JM17 se identificó, mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal, como *Aspergillus niger* (98 % similitud) presenta conidióforo con abundantes fiálidos y conídias sin ornamento (Figura 13).

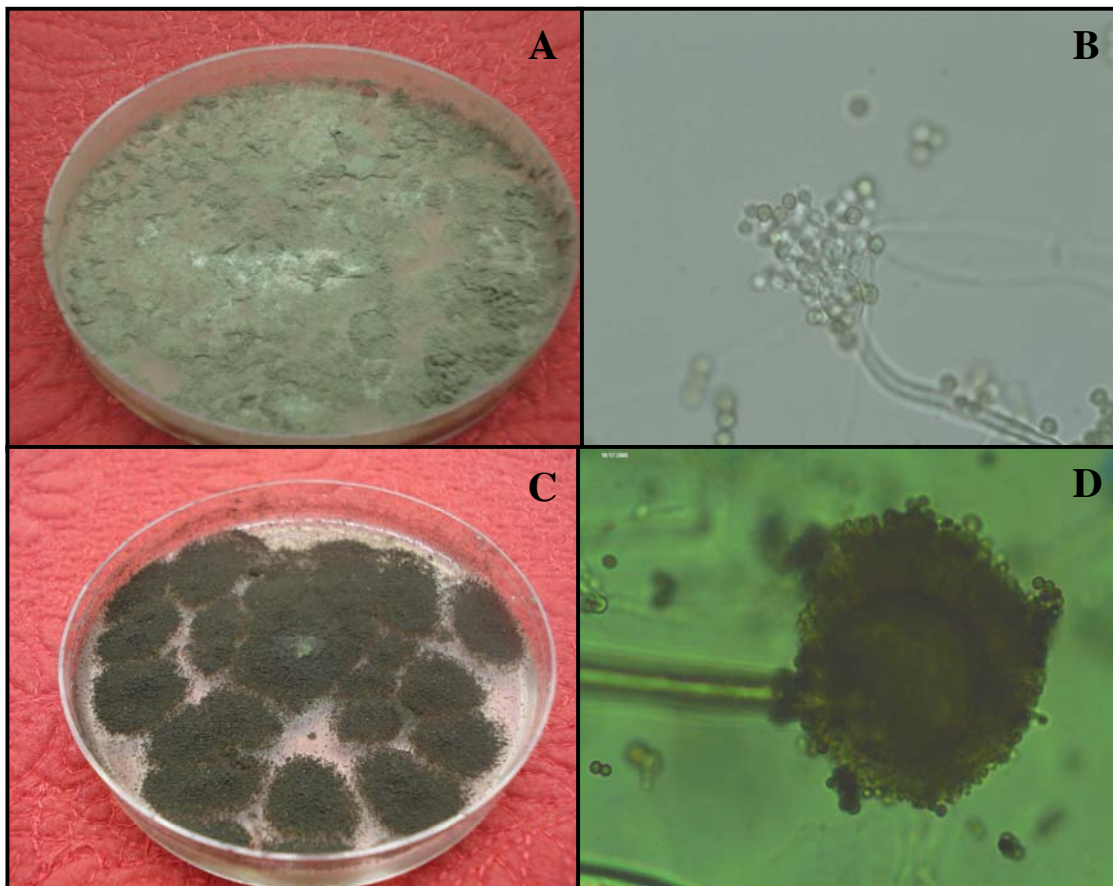


Figura13. *Aspergillus* spp. (A) Colonia del aislado JM18 en PDA (B) Conidióforo y conídias del aislado JM18 (C) Colonia de *Aspergillus niger* en PDA (D) Conidióforo y conídias de *Aspergillus niger*.

***Chaetomium* sp.** La colonia en PDA mostró una coloración marrón negruzca, abundante producción de peritecios redondeados con largas setas (apéndices) filamentosas. Las esporas son unicelulares y de forma ovalada o de limón. El aislado JM2 se identificó, mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal, como *Chaetomium globosum* (98 % similitud) (Figura 14).

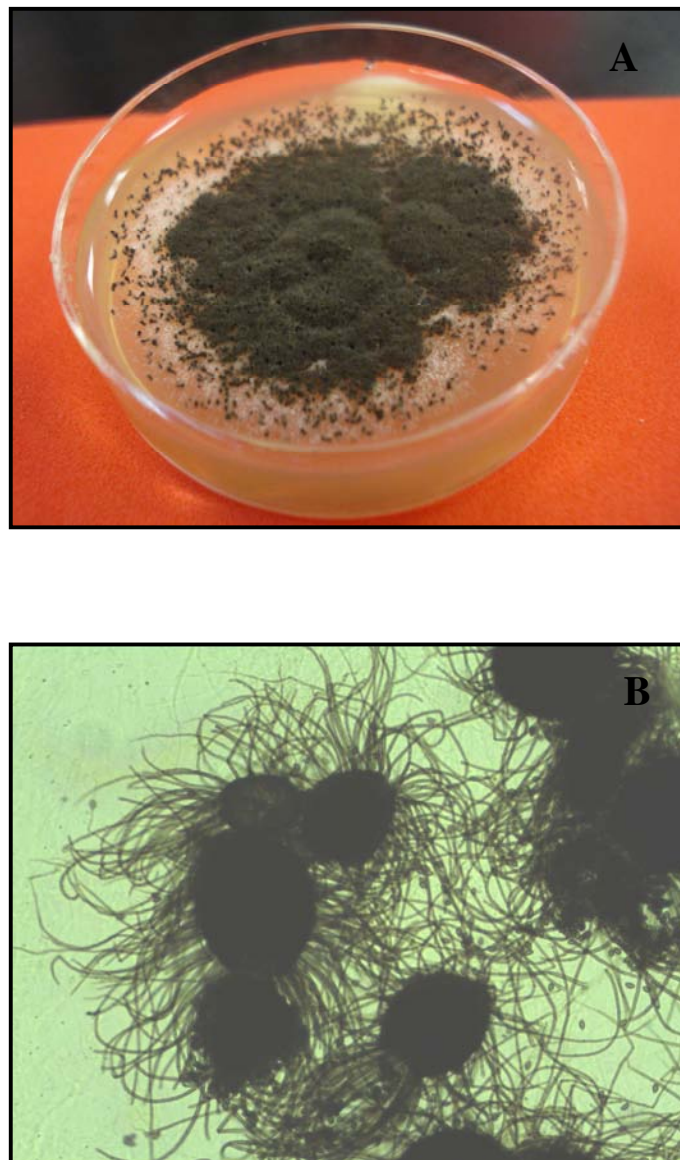


Figura 14. *Chaetomium globosum* (A) Colonia en PDA (B) Peritecios y conídias.

***Fusarium* spp.** Las colonias mostraron una coloración violeta y rojiza, micelio hialino y escaso. Los aislados de coloración rojiza mostraron abundante producción de macroconidias no así en los aislados de coloración violeta (Figura 15). Los aislados se identificaron, mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal, como *Fusarium solani* (82% de similitud) y *Fusarium oxysporum* (83% de similitud).

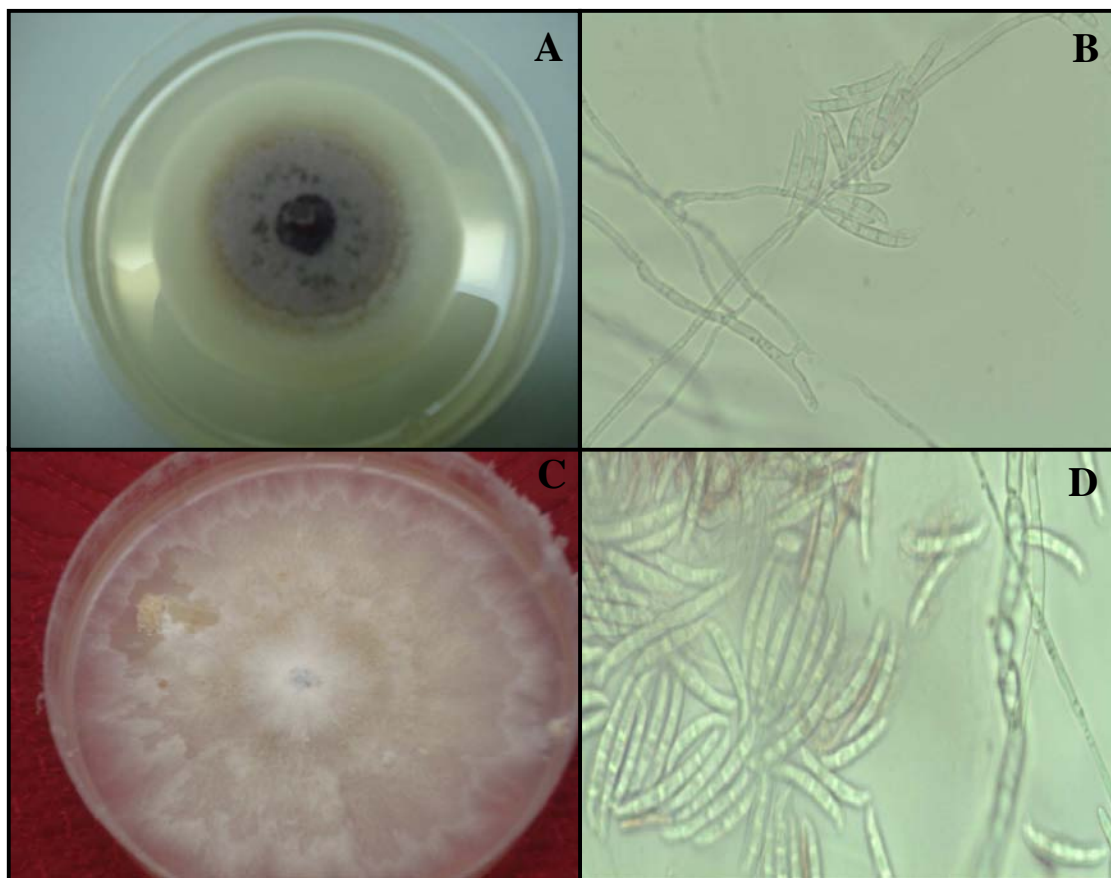


Figura 15. *Fusarium* spp. (A) Colonia de *Fusarium solani* en PDA (B) Conidias de *Fusarium solani* (C) Colonia de *Fusarium oxysporum* en PDA (D) Conidias de *Fusarium oxysporum*.

***Gliocladium* sp.:** Las colonias mostraron coloración verde grisácea en medio de cultivo PDA. La colonia en PDA presenta una coloración verdosa. Muestra conidióforo hialino con abundantes fialidos y las conídias hialinas son producidas en cadenas (Figura 16). El aislado se identificó, mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal, como *Gliocladium catenulatum* (95% de similitud).

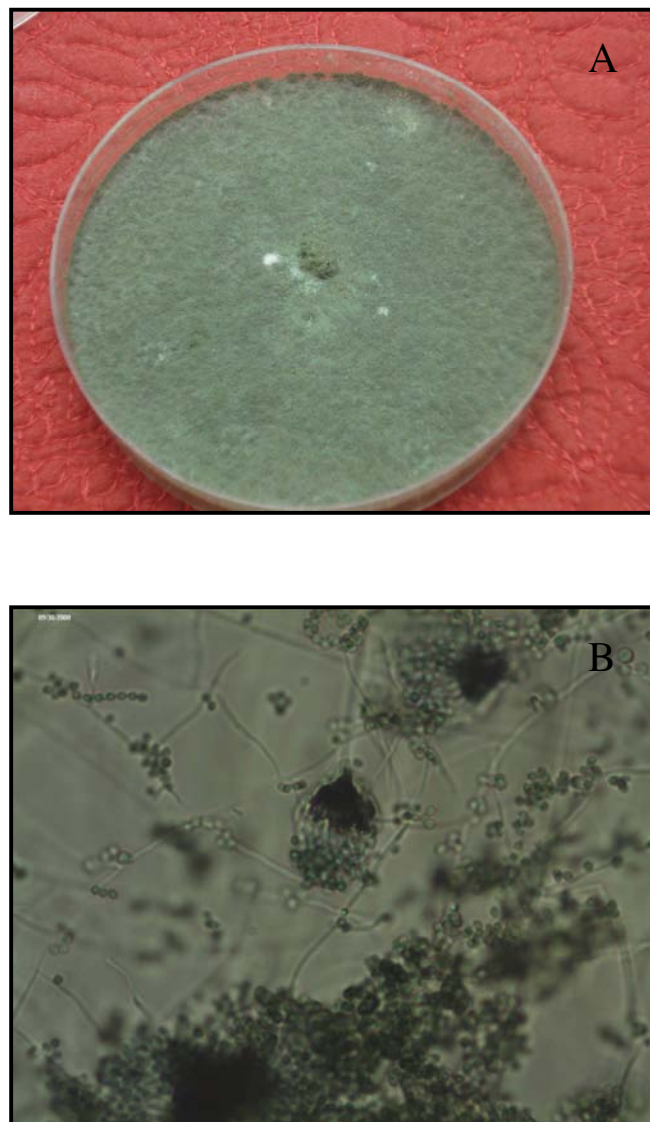


Figura 16. *Gliocladium catenulatum* (A) Colonia en medio de cultivo PDA (B) Conidias y conidióforo.

Paecilomyces sp. La colonia en PDA presenta una coloración blanco grisácea. Conidioforo ramificado y hialino. Las conidias ovoides, unicelulares y dispuestas en cadenas largas (Figura 17).

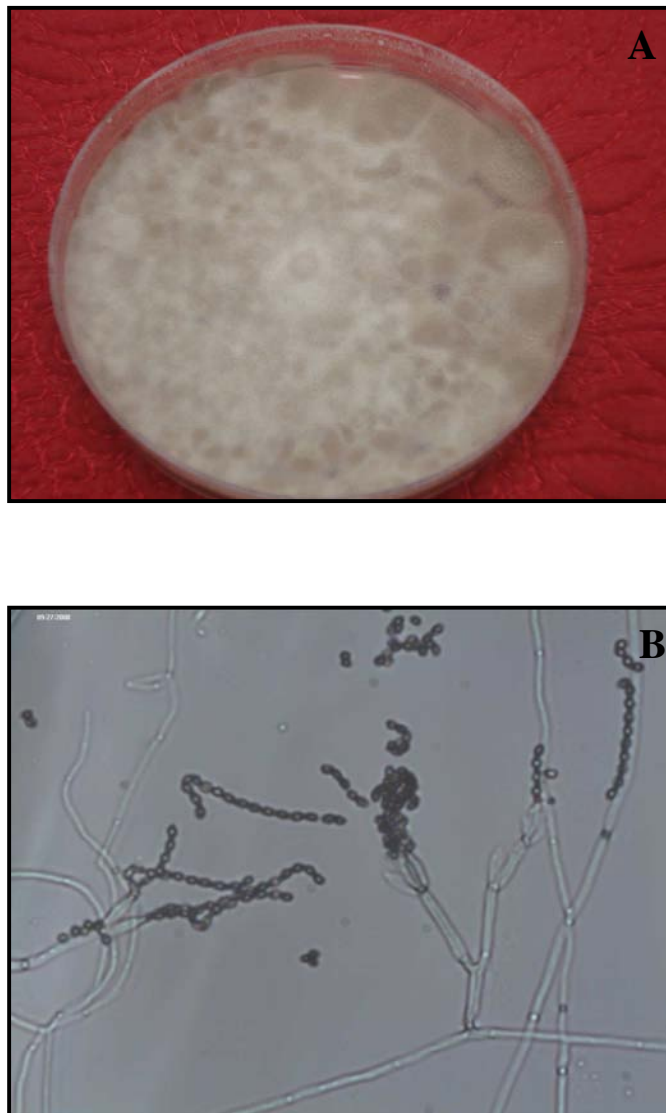


Figura17. *Paecilomyces* sp. (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.

***Penicillium* sp.** Las colonias en PDA de coloración blanca a ligeramente amarilla. Muestra conidióforos simples y ramificados. Las conidias son hialinas, de forma ovoide a globosa y con una sola célula (Figura 18).

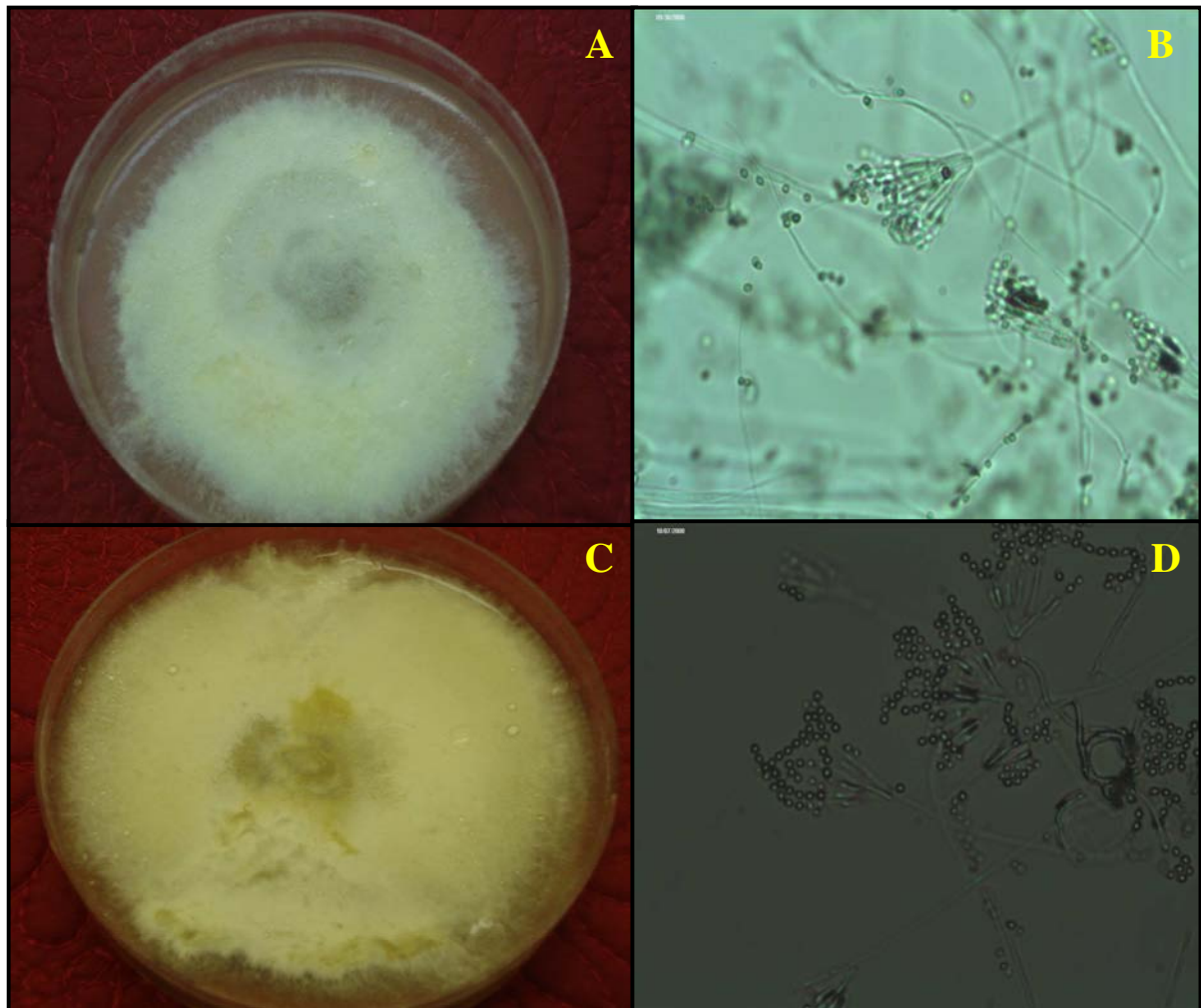


Figura 18. *Penicillium* spp. (A) Colonia del aislado JM2 en PDA (B) Conidióforo y conidias del aislado JM2 (C) Colonia del aislado JM6 en PDA (D) Conidióforo y conidias del aislado JM6.

***Trichoderma* spp.** La colonia en PDA es de coloración verdosa y de rápido crecimiento. Conidioforo hialino y altamente ramificado, con fialidos simples o agrupados. Conidias hialinas, de forma ovoide y con una sola célula (Figura 19). Mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal se identificó como *Trichoderma viride*(98% de similitud).

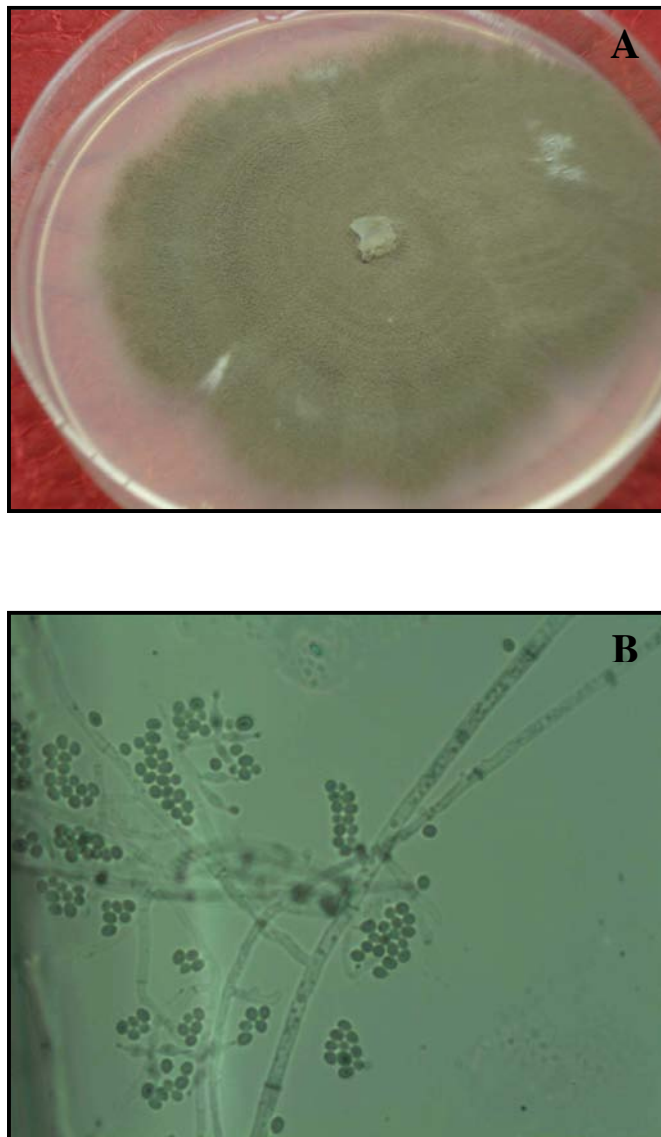


Figura 19. *Trichoderma viride* (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.

***Verticillium* spp.** Las colonias en PDA son blanco cremoso. El conidióforo es delgado y ramificado. Las conidias hialinas de forma ovoide a elipsoide y con una sola célula (Figura 20).

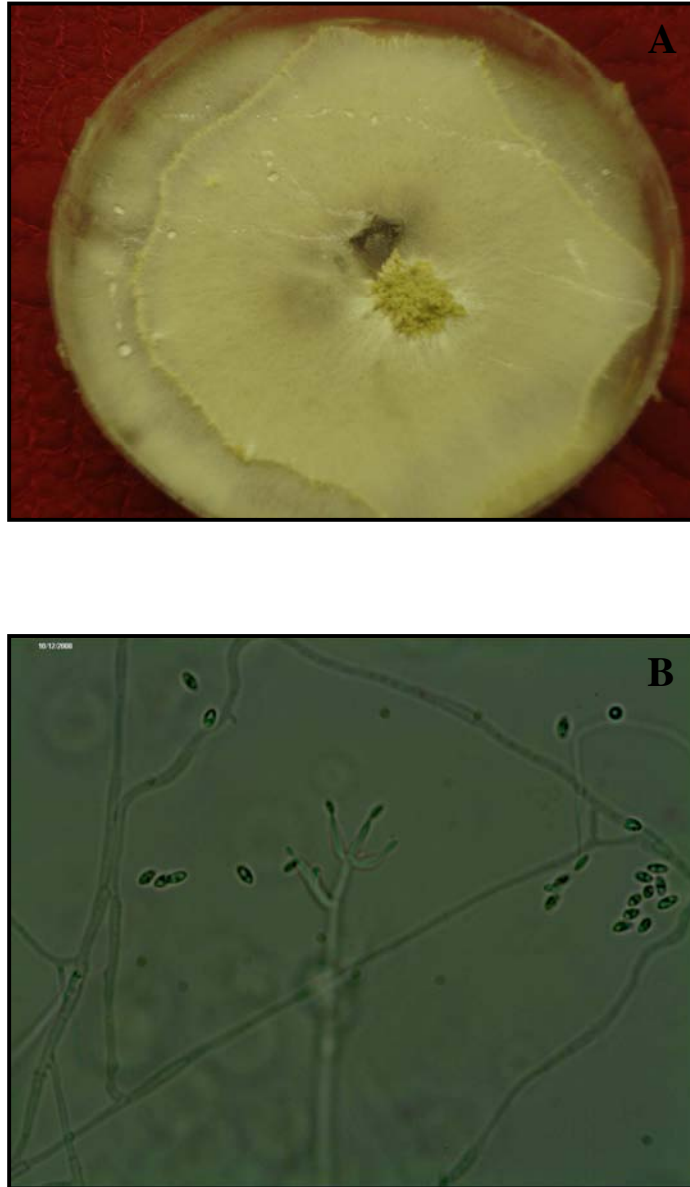


Figura 20. *Verticillium* spp. (A) Colonia en PDA (B) Conidióforo y conidias.

Susceptibilidad relativa de larvas de *Diaprepes abbreviatus*.

Hubo diferencias significativas en la mortalidad causada por los tratamientos en los dos ensayos (ensayo 1: $df =$, $F = 20,75$, $p < 0,0001$; ensayo 2 $df =$, $F = 12,17$, $p < 0,0001$). La mayor mortalidad se observó en los tratamientos con *H. bacteriophora*, además no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control y *Rhabditis* pp. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Mortalidad de larvas de *Diaprepes abbreviatus* a los 2, 5, y 10 días después de la inoculación (n= 5).

Tratamientos	Días después de la inoculación					
	Ensayo 1			Ensayo 2		
	Dos	Cinco	Diez	Dos	Cinco	Diez
Control	0.0 a	0.2 a	2.2 a	1.2 a	2.8 a	3.8 a
<i>Rhabditis</i> spp.	0.8 a	1.2 ab	2.4 a	0.4 a	1.6 a	3.2 a
<i>Steinernema glaseri</i>	1.6 a	3.0 bc	6.2 b	0.6a	3.2 a	5.2 ab
<i>Steinernema glaseri</i> + <i>Rhabditis</i> spp.	1.0 a	3.6 c	6.2 b	0.4 a	3.4 a	6.6 ab
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	1.8 a	6.0 d	8.4 c	0.6 a	5.6 b	7.6 c
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> + <i>Rhabditis</i> spp.	1.8 a	5.8 d	8.4 c	0.6 a	6.6 b	7.0 c

Medias seguidas por misma letra dentro de una columna son significativamente iguales. (Student-Newman-Keuls multiple range test $\alpha=0.05$).

En ambos ensayos la mortalidad de las larvas de *D. abbreviatus* fue mayor según aumentaban los días después de la inoculación en todos los tratamientos (Figura 20).

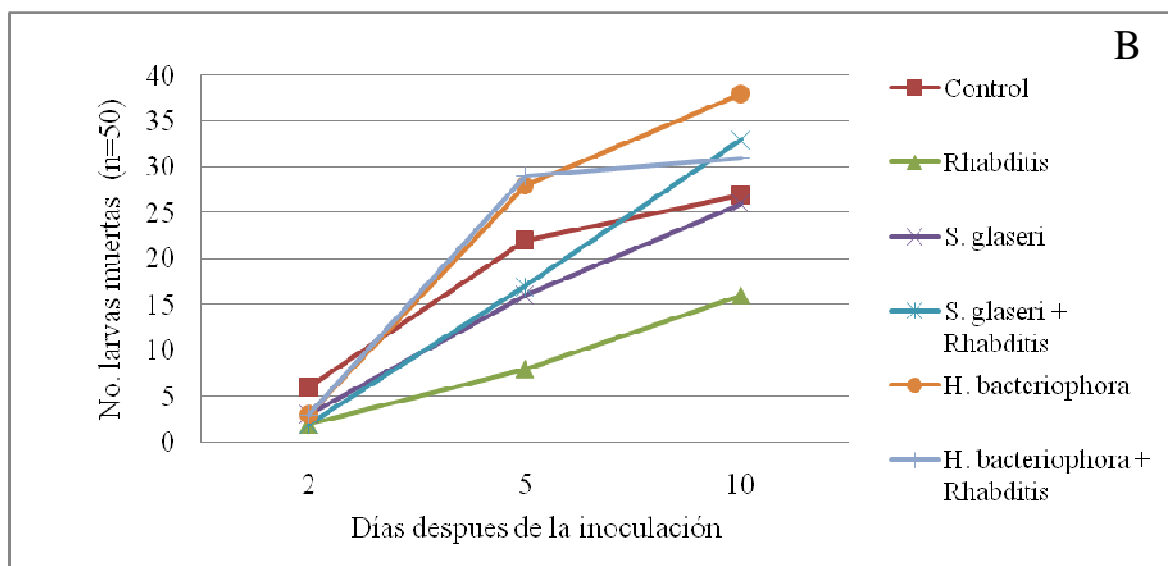
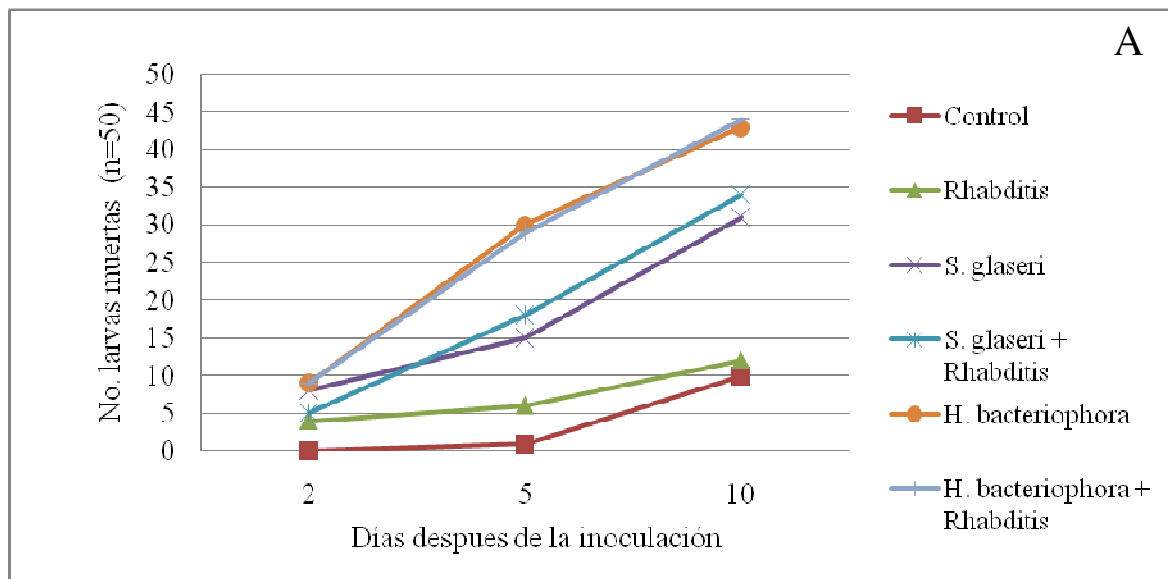


Figura 21. Mortalidad de larvas de *Diaprepes abbreviatus* a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación. (A) Mortalidad en el primer ensayo (B) Mortalidad en el segundo ensayo.

El porcentaje de cadáveres de larvas de *D. abbreviatus* de color rojo en el tratamientos con *H. bacteriophora* fue de (83%), el cual no fue significativamente diferente al porcentaje de cadáveres rojos en el tratamiento *H. bacteriophora* + *Rhabditis* spp. (79%) (t-test 8 df t-valor = 0,35, P = 0,73). En el primer ensayo 14 de los 24 cadáveres mostraron IJs de *S. glaseri* y en el segundo 19 de 28, basado en el tamaño de los nemátodos recuperados (Cuadro 8).

Cuadro 8. Cadáveres de *Diaprepes abbreviatus* que mostraron nemátodos.

Tratamientos	Ensayo 1		Ensayo 2	
	Cadáveres con nemátodos	Total de cadáveres	Cadáveres con nemátodos	Total de cadáveres
Control	0	9	0	18
<i>Rhabditis</i> spp.	7	11	14	15
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	39	42	47	47
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> + <i>Rhabditis</i> spp.	35	40	33	35
<i>Steinernema glaseri</i>	22	30	19	24
<i>Steinernema glaseri</i> + <i>Rhabditis</i> spp.	24	28	28	32

VI. Discusión

Caracterización de poblaciones de NEP

En muestreos realizados en huertos de cítricos de las estaciones experimentales agrícolas de Isabela y Adjuntas desde septiembre 2007 hasta mayo 2008, no se encontraron NEP de las familias Steinernematidae o Heterorhabditidae. Sin embargo, consistentemente, en ambas localidades se encontró asociado a las larvas muertas del gusano de la cera (*Galleria mellonella*) un nemátodo del género *Rhabditis*. En muestreos anteriores en algunos de estos predios, no se aislaron NEP de las familias citadas, a pesar de que en dos de ellos se realizaron liberaciones masivas de *Steinernema riobrave* (Román com. pers. 2008). En estos muestreos no se documentó sobre la presencia de nemátodos de la familia Rhabditoidea.

Estos resultados coinciden con los de Jenkins 2007 (datos no publicados) quien muestreó en 9 localidades, sin encontrar NEP de las familias Heterorhabditidae o Steinernematidae. Sin embargo, en las localidades de Isabela, Adjuntas y Lajas se observó la presencia de la misma especie de *Rhabditis* según la identificación realizada por Larry W. Duncan en la Universidad de Florida (Lake Alfred Experimental Station Road). Chavarria-Carvajal 2007 (datos no publicados) realizó muestreos de NEP en huertos de cítricos en Salinas y Corozal sin detectar la presencia de NEP, ni de *Rhabditis* spp. Román y Beaver (1983) reportaron ausencia total de neoplectanidos (Steinernematidos) en la isla y sólo un espécimen no identificado de *Heterorhabditis* encontrado en Dorado. Posteriormente, Román y Figueroa (1994) describieron la especie *Steinernema puertoricensis* n.sp., colectada en plantaciones de coco del noreste de la Isla.

Aunque los NEP más comunes pertenecen a las familias Heterorhabditidae o Steinernematidae, se ha encontrado que nemátodos de la familia Rhabditoidea, pueden actuar

como controladores biológicos. Caicedo et. al., (2004) realizaron muestreos en huertos de yuca (*Manihot esculenta*) de la región del Cauca en Colombia encontrando un nemátodo identificado como *Rhabditis* spp. n. sp. asociado tanto a chinches de las muestras tomadas en el suelo, como larvas de *G. mellonella* utilizadas como trampas. Además multiplicaron este nemátodo de forma 'in vitro'. Estos resultados coinciden con los del presente estudio, donde se aisló el nemátodo del género *Rhabditis* de muestras de suelo provenientes de huertos de cítricas, logrando también su inoculación y reaislado 'in vitro'.

Del género *Rhabditis* se conocen alrededor de 19 especies (Sudhaus y Fitch, 2001), Según la descripción hecha por Bastian (1865) los individuos de este grupo miden entre 0.5-2.9 mm tienen la cavidad perifaríngea larga y cilíndrica, el esófago es distintivamente muscular con dos bulbos, uno elongado poco visible (bulbo medio) y otro redondeado (bulbo terminal) que contiene un aparato valvular simple. La abertura bucal o estoma es de tipo rhabditoide, no presentan estilete caudal, sedas o papilas; el integumento presenta estrías tanto longitudinales como transversales. Este género se caracteriza por que su cuerpo es más angosto en los extremos. La vulva ubicada cerca de la mitad del cuerpo, son ovíparos o vivíparos. Estas características morfológicas descritas coinciden con las presentadas por el nemátodo *Rhabditis* aislado en este estudio el cual tiene un tamaño promedio de 1.24 mm, es vivíparo y con el cuerpo más angosto en los extremos.

Bednarek y M. Racekz (1986), utilizando la fórmula propuesta por Bednarek, mostraron poblaciones de nemátodos entomopatógenos de hasta 1600 millones por metro² en suelos forestales en las montañas del sur de Polonia. Este resultado es relativamente similar a los obtenidos en los huertos de cítricas muestreados. Wasilewskla, (1981) reporta que las

poblaciones de NEP son relativamente más bajas que las de nemátodos bacteriófagos de vida libre (NBVL).

Caracterización de poblaciones de posibles hongos nematófagos

Al analizar la diversidad de hongos asociados a huertos de cítricos se encontró que existe similitud entre los géneros aislados en Isabela y Adjuntas así como también en las poblaciones. Los 8 géneros identificados, poseen especies reportadas en la literatura científica afectando las poblaciones de nemátodos parásitos de plantas. Verdejo-Lucas, et. al., (2002), encontraron a *Verticillium chlamydosporium*, *V. catenulatum*, *Fusarium spp.*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Acremonium strictum*, *Gliocladium roseum*, *Cylindrocarpon spp.*, *Engiodontium album* y *Dactylella oviparasitica* asociados a masas de huevos de *Meloidogyne spp.* Dong et al. (2004) reportaron que ciertos productos químicos aislados de *Gliocladium roseum* mostraron fuerte actividad nematocida contra los nematodos de vida libre: *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*, y *Bursaphelenchus xylophilus*. Parvatha Reddy, et. al. (1996) probaron que en suelos infestados con *Tylenchulus semipenetrans*, la altura, el peso seco y la longitud de la raíz en plantas de cítricos aumento significativamente cuando se inocularon estos suelos con *Trichoderma harzianum* combinados con la aplicación de tortas de semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

El conocimiento de las comunidades de hongos existentes en la rizósfera de los predios de cítricos muestreados, podría explicar la ausencia de NEP. Leppla et. al., (2007) observaron que las poblaciones de *Steinernema scapterisci* en un suelo orgánico eran menores que en un suelo arenoso con poca materia orgánica. Las aplicaciones de enmiendas orgánicas promueven el crecimiento de hongos y otros microorganismos que compiten o son antagonistas de nemátodos (Ramakrishna, et. al., 1996). Chavarria-Carvajal et. al., (2001) mostraron que el daño por

nemátodos a plantas de soya fue menor en suelos en los que se aplicaron enmiendas orgánicas solas o en combinación con benzaldehído. Además estas enmiendas orgánicas promovieron el crecimiento de especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

Interacción entre *Rhabditis* spp. nativo y NEP introducidos para el control de *Diaprepes abbreviatus*.

Las interacciones entre los NEP y otros nemátodos de vida libre, si ocurren, pueden ser antagónicas, sinérgicas o aditivas. En pruebas realizadas en condiciones de laboratorio con nemátodos bacteriófagos de vida libre (NBVL) y NEP, no hubo interacción entre los tratamientos. Los tratamientos con *S. diaprepesi* y *Pellioditis* sp. + *S. diaprepesi* no mostraron diferencias significativas en la mortalidad de larvas de *D. abbreviatus*, además no hubo diferencias significativas en la mortalidad de *D. abbreviatus* entre el tratamiento con *Pellioditis* sp. y el control (Duncan et al., 2003a). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio ya que los tratamientos en los que se combinó *Rhabditis* spp. con los NEP no mostraron diferencias significativas con los tratamientos en los cuales los NEP se aplicaron solos. Por igual el tratamiento con *Rhabditis* spp., no fue significativamente diferente al tratamiento control. La competencia entre la NEP y los NBVL se puede deducir de su hábito de alimentación compartida (Gerber y Giblin-Davis, 1990), y de la frecuencia relativamente alta con la que se desarrollan los NBVL ya sea solos o conjuntamente con la NEP en cadáveres de insectos (Duncan et al., 2003b).

La mortalidad de larvas de *D. abbreviatus* observada en este estudio concuerdan con los datos obtenidos por Bullock et al., (1999), Duncan et al., (2003b) y Jenkins et al., (2007), a pesar de que en este estudio se utilizó una dosificación menor de nemátodos para poder evaluar las posibles interacciones.

VII. Conclusiones

1. No se observó la presencia de NEP en los huertos muestreados de las familias Steinernematidae o Heterorhabditidae.
2. *Rhabditis* spp. fue encontrado en todos los huertos de cítricas, en ambas fechas de muestreo.
3. La mortalidad de *Galleria mellonella* en las muestras de suelo oscilaron entre el 12 y el 59%.
4. Las poblaciones de hongos fueron mayores en Adjuntas que en Isabela.
5. Los 8 géneros de hongos identificados, según la literatura científica poseen especies parásitas de nemátodos.
6. *Rhabditis* spp. no afectó la patogenicidad de *H. bacteriophora* y *S. glaseri* (Aislado NJ93) a larvas de *D. abbreviatus*.
7. La mortalidad de larvas de *D. abbreviatus* causada por *Rhabditis* spp., a las dosis ensayadas, no fue diferente a la del control.
8. *Heterorhabditis bacteriophora* fue el nematodo más efectivo en el control de *D. abbreviatus*.

VIII. Recomendaciones

1. Identificar hasta especie por métodos moleculares el nemátodo *Rhabditis* spp. y realizar pruebas en el laboratorio, utilizando diferentes dosis de *Rhabditis* spp. para el control de *D. abbreviatus* y otros insectos plaga en el cultivo de cítricas.
2. Evaluar la infección natural de insectos por *Rhabditis* spp., haciendo colectas de larvas muertas y colocándolas en trampas White en las localidades muestreadas así como también en localidades nuevas.
3. Realizar pruebas de laboratorio, inoculando J1 de NEP de las familias Steinernematidae o Heterorhabditidae y *Rhabditis* spp. a platos Petri con cultivos puros de los géneros de hongos aislados para evaluar la susceptibilidad de estos nemátodos.
4. Observar interacción de *Rhabditis* spp. con NEP utilizando dosis de *Rhabditis* spp. más altas que las de NEP.
5. Muestrear en otros lugares de la isla en busca de NEP, así como también caracterizar las comunidades de hongos para identificar posibles especies nematófagas.

IX. Literatura Citada

- Ahren, D. and A. Tunlid, 2003. Evolution of parasitism in nematode-trapping fungi. *Journal of Nematology* 35 (2): 194-197.
- Akhurst, R. J. and M. E. Boemare, 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. R. Gaugler & H. K. Kaya, eds. *CRC Press*, Boca Raton, 75-90.
- Akhurst R. J., 1990. Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In: *Safety of Microbial Insecticides*. M. Laird, L. A. Lacey & E. W. Davidson, eds. *CRC Press*, Boca Raton, 233-240.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter, 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota.
- Barron, G. H., 1977. The nematode-destroying fungi: Topics in microbiology, vol 1. Guelph: Canadian Biological Publications. Pp. 1-140.
- Bastian, H. C., 1865. Monograph on the Anguillulidae, or free nematodes, marine, land, and fresh-water; with descriptions of 100 new species. *Transactions of the Linnean Society of London* 25: 73-184.
- Bedding, R. A. and R. J. Akhurst, 1975. A simple technique for the detection of insect rhabditid nematodes in soil. *Nematological*, 21: 109-110.
- Bednarek, A. and M. Racekz, 1986. The incidence of nematodes of the family Steinernematidae in *Cephalciu falleni* Dalm. (Hymenoptera: Pamphilidae) habit after an outbreak of the pest. *Zeitschnfi für angewandte Entomologie*, 102: 527-530.
- Bednarek, A. and T. Nowicki, 1991. New estimation method for the density of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) in the soil. *Revue Nematology*. 14 (4): 638-639.
- Blaxter, M. L., P. De Ley, J. R. Garey, L. X. Liu, P. Scheldemann, A. Vierstraete, J. R. Vanfleteren, L. Y. Mackey, M. Dorris, L. M. Frisse, J. T. Vita and W. K. Thomas, 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst and R. G. Mourant, 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. novo. *International Journal Systematic Bacteriology*. 43: 249-255.
- Bordallo J. J., L. V. López-Llorca, H. B. Jansson, J. Salinas, L. Persmark and L. Asensio, 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* 154: 491-499.

Bosque, P. N., 1992. Major insect pests of maize in Africa: biology and control. IITA research guide 30, training program. Ibadan, Nigeria. Pp. 28.

Bouwman, L. A., G. H. J. Hoenderboom., K. J. Van Der Maas And P. C. De Ruiter, 1996. Effects of nematophagous fungi on numbers and death rates of bacterivorous nematodes in arable soil. *Journal of Nematology* 28(1): 26-35.

Bullock, R. C., R. R. Pelosi. and E. E. Killer, 1999. Management of citrus root weevils (Coleoptera: Curculionidae) on Florida citrus with soil-applied entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida). *Florida Entomologist* 82(1)

Caicedo, A. M., P. A. Calatayud, A. C. Bellotti. y S. P. Stock, 2004. Una nueva especie de nemátodo asociado al chinche subterráneo *Cytomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en Colombia. Poster presentado en el XXXI congreso de Socolen.

Census of Agriculture, 2002. Volume 1, Geographic Area Series, Part 52. Puerto Rico. United State Department of Agriculture.

Chavarría-Carvajal, J. A., R. Rodríguez-Kábana, J. W. Kloepper, and G. Morgan-Jones. 2001. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. *Nematropica* 31: 165-180.

Cranshaw W. S. and R. Zimmerman 2001. Insect Parasitic Nematodes. Insect Series Home & Garden. no. 5.573. Colorado State University, Extension. www.ext.colostate.edu

De Leij F.A. and B. R. Kerry, 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue. Nematology*. 14: 157-164.

Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2008. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Ingreso Bruto Agrícola, año fiscal 2007-2008. San Juan, Puerto Rico.

Dong, J. Y., Z. X. Zhao, L. Cai, S. Q. Liu, H. R. Zhang, M. Duan, K. Q. Zhang, 2004. Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Fungal Divers* 15: 125-135.

Downes, M. J. and C. T. Griffin, 1996. Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 347-356.

Duncan, L. W., D. C. Dunn, G. Bague and K. Nguyen. 2003a. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology* 35:187-193.

Duncan, L. W., J. H. Gram., D. C. Duna, J. Zellers, C. W. McCoy and K. Nguyen, 2003b. Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology* 35: 178-186.

Estación Experimental Agrícola (EEA). Informe Anual 2002 - 2003. Pp 6-9.

Evans, D. and D. T. Kaplan, 1990. Antagonists of plant-parasitic nematodes in Florida citrus. *Journal of Nematology* 22 (4): 567-573.

F. A. O. 2007. FAO Statistical Databases. Evolución del Comercio Internacional de Cítricos en el 2004-2005. www.faostat.fao.org. Último acceso: octubre 2009.

Fernández, J. 2005. Incidencia y caracterización: morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 167 pp.

Forbel, 2006. Historia del Cítrico. <http://www.forbel.com>.

Gaugler, R. and R. Han, 2002. Production technology. Pp. 289-310 in: R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic Nematology*, New York, NY CABI

Gaugler, R. 1981. Biological control of neoplectanid nematodes. *Journal of Nematology* 13 (3): 241-249.

Gaugler, R. 1978. Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. K. Maramorosch (ed.), *Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture* (Pp. 457-484). San Diego, CA: Academic Press.

Gaugler, R. and G. M. Boush, 1978. Effects of ultraviolet and sunlight on the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32: 291-296.

Georgis, R. and G. O. Jr. Poinar, 1994. Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: A. R. Leslie and U. S. EPA, ed. *Handbook of integrated pest management for turf and ornamental*. Boca Raton, FL, CRC Press. Pp. 477-489.

Georgis, R. and A. Hom, 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. *Nematropica*. 22(1): 81-98.

Gerber, K. and R. M. Giblin-Davis. 1990. Association of the red ring nematode and other nematode species with the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Journal of Nematology* 22: 143-149.

Graham, J. H., C. W. McCoy and D. B. Bright, 2003. *Phytophthora-Diaprepes* weevil complex: *Phytophthora* spp. Relationships with rootstocks. *Plant Disease* 87.

Grewal, P. S., K. T. Power, S. K. Grewal, A. Suggars and S. Haupricht, 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs with new strains of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*. 30: 73-82.

Grewal, P. S., S. K. Grewal, V. S. Malik and M. G. Klein, 2002. Differences in susceptibility of introduced and native white grubs species to entomopathogenic nematodes from various geographic localities. *Biological Control*. 24: 230-370.

Hanlin, R. T. 1990. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Volume I. APS Press, St Paul. Minn. 263pp.

Hominick, W. M., 2002. Entomopathogenic nematology. In: Gaugler, R. (Ed.), *Biogeography*. CABI, Wallingford, UK, pp. 115-143.

Hominick, W. H. and S. A. Collins, 1997. Application of ecological information for practical use of insect pathogenic nematodes. Cap. 2 In: *Microbial insecticides, novelty or necessity?* Symposium Proceeding. No. 68 Farnham, British Crop Protection Council. Pp. 302.

InfoStat. 2008. Infostat, versión 2008. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Jansson, H. B. and L. V. López-Llorca, 2004. Control of nematodes by fungi. In: Arora, DP (ed) *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Marcel Dekker, New York, Pp 205-215.

Jenkins, D. A., D. Shapiro-Ilan and R. Goenaga, 2007. Virulence of entomopathogenic nematodes against *Diaprepes abbreviatus* in an Oxisol. *Florida Entomologist* 90 (2) 401-403.

Kaya, H. K. and A. M. Koppenhofer, 1996. Effects of microbial and other antagonistic organisms and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 6: 357-371.

Kaya H. K., R. A. Beeding and R. J. Akhurst, 1993. An overview of insect parasitic and entomopathogenic nematodes. In: *Nematodes and the biological control of insect pests*. East Melbourne Victoria (Australia), CSIRO, information service. p. 1-10.

Kaya, H. K. and R. Gaugler, 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review Entomology* 38: 181-206.

Kerry B. R., 1988. Fungal parasites of cyst nematodes. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 24: 293-305.

Kerry, B. R, 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology* 38: 423-441.

Lapointe, S. L., J. P. Shapiro and K. D. Bowman, 1999. Identification of sources of plant resistance to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by three bioassays. *Journal of Economic Entomology* 92: 999-1004.

- Leibee, G. L. and J. L. Capinera, 1995. Pesticide resistance in Florida insects limits management options. *Florida Entomologist* 78 (3): 386-399.
- Leppla, N. C., J. H. Frank, M. B. Adjei and N. E. Vicente 2007. Management of pest mole crickets in Florida and Puerto Rico with a nematode and parasitic wasp. *Florida entomologist* 90 (1) 229-233.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell, 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Lewis, E. E., R. Gaugler and R. Harrison, 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology* 71: 785-769.
- Loussert, R., 1992. *Los Agrios*. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 319.
- Mankau, R., 1980. Biocontrol: Fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology* 12 (4): 244-252.
- McCoy, C. W., 1999. Arthropod pests of citrus roots. Pp. 149-156 in L. W. Timmer and L. W. Duncan, eds. *Citrus Health Management*. St. Paul, MN: APS Press.
- Monfort, E., L. V. López-Llorca, H. B. Jasón and J. Salinas, 2006. In vitro soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. *Mycol. Progress* 5: 18-23.
- Morris, M. G., N. M. Collins, R. I. Vene-Wright and J. Waay, 1991. The Utilization and value of non-domesticated insects. In "The conservation of Insects and their Habitats". (N. M. Collins and J. A. Thomas, Eds.) Academic Press, London. Pp. 319-347.
- Moscoso C. G., 1958. The Puerto Rican Chironja: New all-purpose citrus fruit. *Economic Botany* 12 (1) 87-94.
- Nieto, 2001. Fichas técnicas de plaguicidas a prohibir o restringir incluidos en el acuerdo No. 9 de la XVI Reunión del Sector Salud de Centroamérica y República Dominicana (RESSCAD). Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).
- Njos A., 1994. Future land utilization and management for sustainable crop production. *Soil Till. Res.* 30: 345-357.
- Parvatha Reddy, P., M. S. Rao and Nagesh, 1996. Management of the citrus nematodes, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. *Nematol. Medit.* 24: 265-267.

Pimentel, D., V. Stachov, D. A Takocs, H. W. Brubaker, A. R. Dumas, J. J. Meaney, J. A. O'neil, D. E. Onsi, and D. B. Corzilius, 1992. Conserving biological diversity in agricultural/forestry systems. *BioScience*. 42: 354-362.

Poinar, G. O. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pp: 23-61. En: *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. R. Gaugler and H. R. Kaya (eds.) Boca Ratón, Florida.

Ramakrishnan, S. C. R. Gunasekaran and V. Sivagami, 1996. Effect of bio-fertilizer Azolla and Aspergillus on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and plant growth of okra. *Indian Journal of Nematology*. 26(2): 127-130.

Rios, R. F. y R. Parra, 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo en el estado de Jalisco, México (Coleóptero). *Folia Entomológica Mexicana* 52: 41-60.

Román, J. and J. B. Beaver, 1983. A survey of Puerto Rican soil for entomopatogenous nematodes which attack *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 67: 311-16.

Román, J. and W. Figueroa. 1994. *Steinernema puertorricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 78(3-4): 167-175.

Rosales, L. y Z. Suárez, 1998. Nemátodos entomopatógenos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín de Entomología Venezolana*. 13(2): 123-140.

Saenz, A. 1999. Los nemátodos entomopatógenos: una alternativa de control biológico. *Memorias XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de entomología*. 28-30.

Salem, S. A., H. A. Abdel-Rahman, C. P. W. Zebitz, M. M. E. Saleh, I. A. Fawkia and M. Y. El-Kholy, 2007. Interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* as a new approach for biological control of some Lepidopterous pests. *Journal of Applied Science Research*. 3(5): 333-342.

SAS, 2003. Version 9.1 SAS Institute, Cary, NC.

Saunt, J., 1992. Variedades de Cítricos del Mundo; Guía Ilustrada. Siclair International. Pp. 5-9.

Shapiro-Ilan, D. R., R. Gaegler, Loeis-Tedders, I. Brown and E. F. Lewis, 2002. Optimization of inoculation for in vitro production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 31 (1): 313-350.

Sirjusingh, C., A. Kermarrec, H. Mauleon, C. Lavis and J. Etienne, 1992. Biological control of weevils and white grubs on bananas and sugarcane in the Caribbean. *Florida Entomologist*. 75 (4): 548-562.

Sudhaus, W. and D. Fitch, 2001. Comparative Studies on the Phylogeny and Systematics of the Rhabditidae (Nematoda). *Journal of Nematology* 33(1):1-70.

Sudhaus, W. and F. Shulte, 1989. *Rhabditis (Rhabditis) necronema* sp.n. (Nematoda:Rhabditidae) from South Australian diplopoda with notes on its siblings *R. myriophyla* Poinar, 1986 and *R. caulleryi* Maupas, 1919. *Nematological* 35:15-24.

Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw Hill, New York, NY. Pp 633.

Timper, P. and B. B. Brodie, 1993. Infection of *Pratylenchus penetrans* by nematode-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 25 (2): 297-302.

Timper, P. and H. K. Kaya, 1992. Impact of nematode-parasitic fungus on the effectiveness of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 24 (1): 1-8.

Toledo, A. J., 2002. Evaluación de algunos agentes entomopatógenos para el control microbiano de tres especies de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) de importancia económica. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 124 p.

Toro, E. R., 1989. Cultivo de Cítricas en Puerto Rico. Servicio de Extensión Agrícola. Puerto Rico. Pp. 1- 41.

Vector NTI Advance 11. 2008 Introgen Corporation. www.invitrogen.com

Verdejo-Lucas S., C. Ornat, F. J. Sorribas and A. Stchiegel, 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almería and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology* 34(4): 405-408.

Wang, K. H., B. S. Sipes and D. P. Schmitt, 2003. Intercropping cover crops with pineapple for the management of *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology* 35 (1): 39-47.

Wasilewskla, L., 1981. The structure and function of soil nematode communities in natural ecosystems and agrocenoses. *Polish ecological Studies*, 5: 97-145.

Webster, J. M., 1980. Biocontrol: The potential of entomophilic nematodes in insect management. *Journal of Nematology*, Volume 12, No. 4

White, C. F., 1927. A method for obtaining infective larvae from culture. *Science* 66: 302-303.

Woodring, J. and H. K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Southern Crop Bull. Pp. (3) 30-31.

Wright, D. J. and N. Patel 1996. Biochemical ecology of entomopathogenic nematodes. Proceedings of third Int. Nematol. Congress Guadeloupe.

X. Apéndices

Apéndice 1. Secuencias editadas de la región ITS1 e ITS4 de 20 aislado.

>JM1(ITS1)

ATGTGTAAATTACTACCCTATGGA AKCTCGACGTGGCCGCCTMTGTATTTGGGGAGT
GCAGCAGGACTGCAGCTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACACTC
GAACAGGCTTGCCCGCCAAAAGACTGKYGGGCACWTTGTGCGTTCAAMGATTCTAT
GATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGATCTTCATCTA
TGCCCTAACCMCCAGATCGGTKGTKGAAGSTTTTGATTTGTTTGTTTCTTATACTCCA
AWGTTCCACTMATMAAGCATTTTAAAGGTTTCCTGCGGCGGGCCGTCCTTTTTACGG
GGCGCGGGCTGATCCGCCGACCCACCTTCTGAATGTTCACCTCGGATCGGGAATGA
WTACCTSCTGA ACTATCGCTYMT CATATCAGCCAAGAGAAGGATCTTTACGAGTTTA
AACTCCAAACCCCTGTGAACATACTTATGTTGCTCGGCGATCACCCGCGCCCGTAA
AAGGGACGGCCGCGCAGACCTAACTCTGTTTT

>JM1(ITS4)

TGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGG
GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTT
ATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTGATTTATTTGTTTTTTATACTCAGAAGTTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGTTC
CTGCGGCGGGCCGTCCTTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACATAA
GGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTCAC
CCTACAGAAGGGTYTTTACGAGTTTACACTCCAACCCGCTGAMAAAATAATTTTGCT
TGCCTCAACGCTCGCCCGCRCCGGTAGA

>JM2(ITS1)

TCTCCTGGACCGAGGTCACMTTCGAAGTTGGGGGTTTTTCGGCTTGGGCGCGCCGCTC
TCCYTTCCGGGGTGTGTCTTCTGCSCASTGGACTCTGCTGGGATTACCGCCTCTGTTT
ATGGGGGAGGGCGTCTGCCCACTCTTGCTTTACGCCYATCATGTCTCCGGGCTCGA
TGACGAGCGGATTGAAATGCMATTAGAAAAGTCATGTGCACTGTAAAATTGGGCGG
CGCATTGTGCGTTCCACATCGCATTTGATTA ACTGTTCTGGGGGGKTTGCCTTTCCTAT
CGCATTTCCMTCCCTCCCGCCCCGAGGCCAGAGCGAGGAGTTGGGGAGAGGRCCCC
CTTATTTGRGTCGCCGCCCCCTAAATACAGAGGGGRTRACGCCCKCAGCTTCCCTTGC
GTRGGGCTWGMGCCTCCCAASTGGAGAGSGSCGCGGCCCMGCCGTAAAACCCCAA
CTTGTGAGTGTTGACCTCTGATSAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TARCCGGAGGACAAAATCATTACGAGTCTAACCWCTCATCACCTG

>JM2(ITS2)

CAGACAGGCATGSCCGGCACAATACTGGAGGGCGCAATGTGCGKTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGYATTTCACTGCGTTCTTCATCG
ATGCCAGAACCGAGAGATCMGATGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGTAAAACTACTC
ACAAAAATCAAAATAAAACAAGAGTTAGAGTTCCTAGGCGGTGGCCTGATCGGGGG
CACACGAGGCGCCCCGGGGCAATCCCGCCGAACCCACAATAGGTATGTTACATGGG
TTGATGGAGTTGTAACTCKCGTAATGATATCTCCGCACGTCWCCCTACAGGAGAA
ATMATTACGAGAGTWTMCACMMCCACACGGATRAMGAACATACGAATTGTTGCGT
CGGCGACGWTGGCCYGTGCGCGGCGTGCTGCCCCGGAATASGCGCTCGCTTGGCAAC
TCTAC

>JM3(ITS1)

TGACGGTTTRAATGACGCTCAAACGGGCWTGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCWR
TGTGCGTTAAAGATTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACRTTACTTATCSCATT
TCGATGCGTTCTTCATCCATGCCGCAACCAAGAGATGCGGTGGTGAAAGTTTTTATT
TATTTGTGGGACTACCGGCCCTTCTCTAATGGMGCACGAGTTTGTGGTTTCTACKGS
GAMGTCGGATCCGGGGCATCGGAGGCGCCCCGGGGCGATGCCGTCGAACCAACGATT
TGTATGGGCTSATGTCTTATCGAGTTGTAATCTCCGGTWGTGATCATCTCTCAM
GCCGAAGAAGATCATTACGAGTTTTMACTTCAAACCATGTGAACATACTATCGTTG
CTTCGCGGATCCCGGSCTCGTGTGCCGATCGGCGCTAGAACTTACCTGG

>JM3 (ITS4)

TGATCTCATGATCTGAGGTCACCTTGGAAGTTGGGGGTTTAACGGCAGGGGCTCGTC
GCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCCACGACGGGTCCGCCAC
TAGATTTAGGGGCGCGCCGTCCCTCGCGGGCTTTGGCCGATCCCCAACACCACGCCC
TAGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGC
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
TTATCGCATTTGCGTTCGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAA
AGTTTTTATTTATTTGTAAAACTACTCAGAAGATTCAAATAAAACAAGAGTTAGA
GTTCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGGCACACGAGGCGCCCCGGGGCAATCCCGCCG
AAGCAACAATAGGTATGTTACATGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATC

>JM4(ITS1)

TACCTTATGTTGTGTTGCCGCTGGRGCGYCGGCCTCCGCCCCTACCCAATGCGGACT
ATSCCCTCCCTTCCTMCGCACAAGGCTCCCGCATTTTACACCGCCACTGTATTTCCG
GGCCTACGGGGGTCTRCRAAKACTCACCKTAGCCCCCAACMCCKACCCTGGGCTTC
CCTGAAGAAACGGAGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGKACAGGCATGCCCGGCA
GATTACTGCCGGGCGCAATGTGCGTTCACAGATTCTATGATTCMCTGAATTCTGCTM
TTMACATTACTTATCCCATTTCACTGCCTTCTTCATCGGTRCCCCAACGGACAGATCC
GGGGCGCAACGGCGAGTCTTGGCGACCCCGTAGGTCCGAAGTGTAGTGGCGGTCC
CGCCGCGGTTGCCTTCTGCGTAGGGCGGCACGTTTGYCCGCTCGCTTTGGGACGGGG
CCGAGGCGTGGCGTCCGAGGCCTAGAAGTCCAGATGGTTTGACCTCGGTACAGGTAG
GGTTACTCGCTGATGTAGCACACATAGCCSGGAGGAAAAGATCATTACGAGTTCTAC
TCAAACCATTTGTGAAGTTACCTTATGTCTGTTGCTCGCGGCGTCG

>JM4 (ITS4)

TTGGGGGTTTAAACGGCAGGGGCTCGTCGCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTTCGC
AGAGGAGGCCACGACGGGTCCGCCACTAGATTTAGGGGCGGCGCGTCCCTCGCGGG
CTTTGGCCGATCCCCAACACCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCA
GACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATG
ATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGTAAAACTACTCAG
AAGATTCAAAATAAAACAAGAGTTAGAGTTCCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGCA
CACGAGGCGCCCGGGGCAATCCCGCCGAAGCAACAATAGGTATGTTACATGGGTT
TGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCACGCCCCCTACGGAAAGATCATT
ACCGAGTTTACAACCTCACACACGCRTGTGAACATWCGTATTGTTGCTTCGGCGCGAT
TGCCCCGGGCGCCTCGTGTGGCCCGMTCAGGACGCTCGCCTAGKACTCTACTCATGC
TTWATTTGATCATCTGAGTAGTTTTACGAATCAATGAAACGTTACACGGAATCTCG
TGGATCTGCATCGATGAGACGCAGGAATGGAAGATTGTGCATGCAGATCAGTCATC
ATCGGGAGGCGGT

>JM5(ITS1)

CACCTGATCTGATGTCACCTTGTATAGTTGGGGGTTTACGGCCGGGGCTCGTCCCTCT
CCGATGCCGAATATCACTACTTCCTAAGAAGGCCACCTCTTGTTTTATTTTGGATTCT
TGGGACGGCCGTCCCTTGTRGGTCTTGGCTTATCCCCACGGATCTCYTGATTCTGGTG
TCGRTTAAATGACRCTCAAATGCGCTTGCCRCGTGAATACTGGAATTCGCTGAAT
GCTTTTCATCTTTGAATGACATTGGGCCCCGCCAGTTTTCTGKTRGKTATGCCTGTYTGA
TCSTYTTTTTCATCCCTSCTGCACCTAGGGCGTGSKGTGGGGGATCGGCCAAGGCCCG
CAAGGGACGGCCGGCCCCCTTTCCTAATGGCGGACCCGTCGTGGYCTCCTCTGCGAAG
TCGTGATGTTCCGCATCGGAGAGCGACGAGCCSATGCCGTTAAACCCCCAACTTTTA
TGTGTTGACCTCTTAKSGAGTAGGAATCTCCGCTGAGATCCCTCATATCGTAAAGCC
GGAGGAGGATCATTACGAGCTTTCCTCAACCCATGTGAACATACCTATCGTTGCT
TCKGCGGGATCGCCCCGGGCGCTCGTGTGCCCGGATC

>JM5(ITS4)

TTGGGGGTTTAAACGGCAGGGGCTCGTCGCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTTCGC
AGAGGAGGCCACGACGGGTCCGCCACTAGATTTAGGGGCGGCGCGTCCCTTGCGGG
CCTTGGCCGATCCCCAACACCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCA
GACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATG
ATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCCRGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGTAAAACTACTCAG
AAGATTCCAAAATRAARCAAGAGTTAAGGTTTCCTASGSGGGCGCCGGATCCGGGGC
ACACGAGGCGCCCGGGGCGATSCCGCCGAACCAACGATTGKTATGTTACATGGGT
TTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCACGTACACCCTACGGAAG

>JM6(ITS1)

TGTCTCTATGCACCTGTTGCTTTGGCGGGGGCCCTTCCCGCCCCCTGGACGCCGGGGGA
ACGCTTCTCCGGGGCCCGGACCCGCCCCTGCTTTTCGGGGCCCTGATCGGATGGACTG
TCTSAATACTGTRACCATTGTTGAACTTTCAATGTGGATCTCTTGGTTCSSGCCTCGA
AAAGCAACGCRGCGMAATGCGATWAGTAATGTGAATTGATTAATTCCGTGAATCAT
TTCATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTCTTTTCCGGGGGGGAACCATGAGATAC
CTTGTTGAAAGTTTTGACAATTTTCTYGGTACTCRGACGGCCCATCTTCGTCAAGGTG
CACRAARGGCTTCGGCGRSTCGGGCCGGGAGACGTGCGTCCSCCGGYCACCAGGT
GGCCCSGGAGGGACCGGCGAAGCTASATGTGTATAAWGACAAGGGTGGGAGGATG
GGCCGCGAGGGCCCGCTCTCGCGCATGATCCTAGCGTATGACACCCTACAGAAATCT
TTCGAGTGYGGGCTCCGGCCAACCTCCCCCTTGTCTCTATACTGTGCTTGTGGC
ACGGGGCACTGG

>JM6 (ITS4)

GGTCCTTCCCGAGCGAGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCAGACGGACGTCCG
CCGCTGCCTTTTCGGGCAGGTCCCCGGGGGGGACCACACCCAACACACAAGCCGTGCT
TGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCA
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTG
ACAATTTTCATAATACTCAGACAGCCATCTTCATCAAGGTTTCACAGAGCGTTCCGG
CGGGCGCGGGCCCGGGGACGTGCGTCCCCCGGCGACCAGGTGGCCCCCGGTGGGCCC
GCCAAAGCAACAGGTGTATAGAGACAAGGGTGGGAGGTTGGGCCGCGAGGGCCCCG
CACTCGGTAATGATCCTTCCGCATGTCACCCTACGGAAAAATCATTACCGAGTGC GG
GCTCTCGCGGCCCAACCTCCCACCCTTGTCTCTATAACATGTTGCTTTGGCGGGCCC
ACCGGGGCCACCTGGTCGCTGGGGGACGCACGTCCC

>JM7(ITS1)

CCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGCTGCCYCCGCTGCCTTTCTGGCCCCGCCCTCC
GKGAGCCGGGGGGCGGGGGCCCAACACACAACCCGTGCTTGAGGGCAGKTTTGACC
CTCGAACAGGCATGCCCCCSGAATACCAAGGGGYGCGATTTGCRTAATAAGACTC
ATCAATTCCTGAATTCTGCAATTCGTTTACTTATCTRATTTGGCTGSGTTCTTCGTG
ATGCCSAACCATGACATCCRTTGTTGAWTGTTTTWASTGATTTAGCTAATCGCTCA
CAGGGYRATCTTCACACAGCGTTSAGGGGGGGCTTCGGCGGGTGCGGGCCCGGGGG
CGGGTGCCCCCGGCGGCCATGACGGCGGGGCCCGCCGAARCAACKACGTATGATAA
ACAYKGGTGGGAGATTGGACGCAGAGGGGCTCACTCGCTAATGATCYGTCCGCAA
GTAAACCTACGGAAG

>JM7(ITS4)

GGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGG
GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT
ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTAATTTATTTGCTTGTTTACTCACAAAAACATTATAAAAAACAGASTTAGGGGTCC
TCTGGCGGGGGCGGCCCGTTGTTACAGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAAGCAACGTTTT
ASGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCA

>JM8(ITS1)

CCCCTCACCTGYGAATTGCTATAATGGSSGGTGTTCGGCGGGYGTCTASCCGAGGG
TCCTCCCTCCCCGGGTACCGCATTCCGCCRGGGGGCTACTATACTCTGTGCTTTGGG
AGGCTGCGTGCGAGTACCTCCACGCCAGGCAGGGCCTGACGGTTGAAATGACGCTC
GAACGGGTCTGCCAGCAACAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTMATTGATTAAAT
GACTCACTCAWTTCKCTTTAACATTACTTGTSCCATTTTCGCTTTCTTCTTCATCTG
CCTGTTTCGAGCGAGATTGTTCTGAAGCCCTGCCTGGTTTGATTGTACTGCGCATGCC
GCCTCCCAAAGAAGCGGCGGCGGCCCGCCGACTTAACGMCTTRCGTATCGA
TGAGCCTCTGGGACACTGCCCTGCCAGAAACCCGCTTCTATTCAATGSTTGACCTC
GAATSAGGCWTGAGTACCCGTAATGATCCGTCTATAATCCGCCSTACGGAGGATCT
TTTCGGGATCGCAAGACTCTACAACCCTGTGAACCTACTATAGCACGTTGCTTTCG
GGGTGTYTCGGCG

>JM8 (ITS4)

ACCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CCGGAATGCCAGGGGGCGCAAGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTG
CAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG
ATCCATTGTTGAAAGTTTTGACAATTTTCATAATACTCAGACAGCCATCTTCATCAA
GGTTCACAGAGCGCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGACGTGCGTCCCCCGGCGACC
AGGTGGCCCCGGTGGGCCCCGCCAAAGCAACAGGTGTATAGAGACAAGGGTGGGAG
GTTGGGCCGCGAGGGGCCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCATGTACCCCTACGGAA
AAATCATTACCGAGTGCGGGCTCTCGCGGCCCAACCTCCCACCCTTGTCTCTATACA
CATGTTGCTTTGGCGGGCCACCGGGGCCACCTGGTCGCTGGGGGACGCACGTCCCG
GGCCGCGCCCCGCCGAAGCGCTCTGTGACCTGATGAGATGGCTGTCTGAGTACTGTGA
ATGTCAACTTCAACAATGGATCCTGGTTTCGCATCGATGAGACGCAGCGAATGGCGAT
AGATAATGT

>JM9(ITS1)

AASCCGGGYCCGGGGGCGCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACGGGCATGCCCCGCCA
TAATACTGGCGGGCGCWCTGTGCGTTCAAATATTCGATGATTCACTGAATTCTGCGA
TTCACATTACTTATCKCATTTTCGCTGCTTTCGTCTTCGGTGCCGGAGCCGGGAGATCC
GCTGTTGACCCTTTTAATTTATTTGCTTGYTTACTCACAAAGRCGGTCCCGCCGCAGC
TTAGGGGTCTCTGGCTGRGGCSGCCGTCKGGACAGGGGGCGCGTGTTTGCSGTAAA
ACACCGTTCTTCTGAATGTTACCGGGTTGATGAGTTGGAATAACTCGCTGATGATC
CCTCMTCATATCCCSCCAGGARAAAATCATTACGAGTTTATAACTCATCACCTGTG
AACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCTGTAGC

>JM9(ITS4)

GGGCCTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATGCTGGCGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCRATGACTCACGGAATTCTGCAATTCGCATTACTTA
TCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT
TTTAACTTGTTTGATTGTACTCGAGATGCCAACGCAAAGAGACAGAGTATAGTACGC
TGCCGGCGGGCTTAGCGCCCCGGGGAGGGAGGACCCTCGCCGAGACACCCGCCGAA
GCAACGTGCTTATAGTTAAGTTCACAGGGTTGTAGGAGTCTTGCGAGTCCTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTCACCCTACGGAAGATATTAGGGGACTCGCAAGCCTCCTACAGC
GCTGTGAACTTACTATTGCWCGTTGCTTGGYCGGGTGTSTCGGCGAGGGTCGTCCYT
CCCCGGGGCGCTAGCACGCGTCTGCCTA

>JM10 (ITS1)

TCAGCTCTGAGACCCATCTTTGTTGTGATGTGGCGGSACGGCCGGGCTCCTCCCCTA
CCCAGGTGSCTTGGCYCCTCCCTTCCTACGCACAAGGTCCTGCGGCAGGAKCGGATT
GTRTTTTSATTTGAMTGGGGTAACKAATACTCACCTTMCCCCGCCGAYCTCTWGGTT
GKGATTYCCTTRA AAAACGCAGGGTAATGCGATTAGTAGWGTGAATTACGTAATTG
CCCGGATCATCCTGCTTTSACGGGRTTGTTCCCGGRSSTATGMTTCTCGGAATGCTTG
TTCTACCGTCATTTACCCATTTAWCCGCGYTTTCCTCCGGTAASCCAACGGTCAGA
GCTGGGGCGCAAAGTCSAGTCTTCGCAACCGCCGTGGGGCCCCGAAMTGSAGTCCGG
ATCCCGCCGCGSAGCCTGCTGCGGCCGATGTCWCTTTMGCCAGCTCGTTTTGGGTCS
GGCCGKAGGCGTGCGCKCAAACCCCGTAGAACTCCTGATGGGTTGACCCYGGGGAA
GGTAGGGTTACCTCGCTGATGATAGCACAKCAAKATGCCGGAASGAGAA

>JM10 (ITS4)

GCCATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGC
ATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG
AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGC
CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATTTATTTGCTTGTTTACTCAGAAAAACATTA
TAAAAACAGAGTTAGGGGTCCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTTGCTACAGGGCCGTCT
GTTCCCGCCGAAGCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAGTTGTATAACTC
GGTAATGATCCCTCCGCA

>JM11(ITS1)

AGTCTTTGGTTATGAGCCAAAAGACMAGACGCCAACAACCAAGCRAAGCTTGAKGG
TACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCRATTCACACTACCTATCGCATTTTCGYT
GCGTTCTTCATCGATGCCAAAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAATGATTT
ACATTTGTTGTACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAAGGTTTATGGTGTGGTC

CTGGTGGCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAACAAGTGCGCTTTTTGCGGGTGAAAT
CAATAATCCAGCATCGGCCTCACTGCGCACGACAGCTCASSCTCGAMCTGSCATCAG
GTGTGGWTGCGCGCTGATCCCTCCGCATATTCATCAKCCGGAAGAAAAATCATTCC
AATAACATATGAAGGCTGTACGCGGCTGTGCTCTCGGGCGCAGTGCTGCTGAGCTG
>JM11(ITS4)

AAGTTGGGGGTTTAACGGCAGGGGCTCGTCGCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTT
CGCAGAGGAGGCCACGACGGGTCCGCCACTAGATTTAGGGGCGCGCCGTCCCTTGC
GGGCCTTGGCCTATCCCCAACACCWCTCCCTATGGGCATGACGGTTTAAATGACGCT
CAAACRGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCAGGKCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCMCGTTACTTATSSCATTTTCGATGGGTTYTTCATCC
ATGCYGCAACCAAGASATGCGGTGGGGAATGGGCCAAGGCCCCGCAAGGGACGGCC
GGCAAGATTCCCAAGTGRAGSACGAGTTGWGGTTTCTWCKGGGAAGTAGTGATCCG
GGGCATCGAGGAGCGACGGGCCGATGCCGYCGAAGCAACGATTTGTATGGGCACAT
GTGTTTGGGAGTAGTAATCTCGGTAATGATCCCTCATCACGTTACCTRCAGGGGAT
CATTACGAGTTTCACTCCAACCATGTGAACATACTATGTTGCTTCGCGGATGCC

>JM12(ITS1)

AAAAAGGGGGGGCCCCCATACGGTGGGTTGTTTGRTGTTTTTTTTGAAAAGGGGGCCCYT
YTRGGGGGGGGTGGKKGGGGRAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCKTTTTMKRGARGGGG
TTTKTTTTAAAAGGGGTCGGGRGGYKGGKTTTTTTTWTTTTTTTMTTTTTTAKTTTTW
WTAWAWATAAAAAAAA

>JM12 (ITS4)

ACCGCCACTGTATTTTCGGGGCCTACGGGGGTCGCGAAGACTCGCCGTAGCGCCCCA
ACACCGACCCTGGGCTTCCCTGAGGAAACGGAGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTC
GGACAGGCATGCCCGGCAGATTACTGCCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGA
TGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTGTTTTTTGTTTTCAAATCA
GAACTGTAATCCGCTGTAAAATTCAAGAGTTTGGTGCTGCCGGCGGGAGGGGCATC
GTCCTCTTTTCAGAGGGGGCGCTGACCGACGCCGCCGAGGCAACAGAACATAAGGTA
AGGTTCACAATGGGTTTGGAGTAGTAACCTCTGTAATGWCCCTCCGCATCCCCCCCC
WCGGAAATATCCTTAMGGAGTTGGGCTCTAAGAGTCGTGAACKCCCTKATGTTMW
GTTGCTCGGCGCGTCGTTGCGCCCTCTGAGAAGAGAWATCCATCCGCAGCGMCATA
CYTGAATTKCAGCGGACTCGTTTATGCACAAAACAGTAACTTTCAGACTGTCCTTAT
AAGACACGAGCCTAATGGTTTGTCCACGATACGTCATCATGTAAG

>JM13(ITS1)

TAGGGGCGGCGCGTCCCTCTCGGKCTTTGGTCTATCCCCAACACCACCYCSTATGGG
SATGAGGGTAGAAATGACGCTCAAACMGGYATGCCCGCCAAAATACTGGCKGGCGC
RATGTGCSTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCWGRTTACTTATCCY
GTTTCACTGCGTTCTTCAYCCWTGCGCCAMCCAGGAGATCCGTTGGGGATCGTTTTT
AGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCCCTATTTCTAATGGMGGACCAGTYGTGGTCYCTW

CKGCGAAGCCTGATCCGGGGCATCGGAGAGCGCCGAGCCACTGCCGTYRAACCAAC
AAYTTGTATGGGCTGACCTCTGATGAAGTTGKAATATCGGCAGTGATCAAGCATCTC
TAMACCCTGMGGAAGGATCATTACGARCTTTAAACTCCAAACCATGTGAACATAACC
TATTGTTGCTTCGGCGG

>JM13(ITS4)

CCCCATACGCTCGAGGACCGGACTCGGTGCCTCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGCCCCC
AGGAGCCGGGGGGCGGGGGGCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGAC
GCTCGSACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCTTTCAAAGACT
CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCTCATTTCGCTGCGTTCTTCA
TCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGCTAATCGC
TCACACGGCAATCTTCAGACAGCGTTCAGGGGGGGCTTCGGCGGGTGCGGGCCCCG
GGGCGGGTGCCGCCCCGGCGGSCATSACCGCGGGCCCCGCGAATAACGACATATGAT
GAACRCKGGTGGGAGAGTGSACGCAGASGGCCCTCACTCGTCMATGATTCACCTRC
ARGAAGACCTACGG

>JM14(TS1)

CACTTCCATACCCTGATGTCACCTTGTAATGTTGGGGGTTTAACGGCTGGGGCTCGT
CCCTCTCCTATGCCGGATATCACTACTTCCTGAGGAGGCCACTCTTGTCATTTTGAA
CTAGGGRCCGGCCGTCCCTCTCGGTCTTTGCTTTATCCCCCGGATCTCTTGATCKGG
CTGAGGGTAGAAATGACGCTCAAAGCGGTATGYCCTGCGAATTACTGAATTCCGCG
ATGCGTCTTATCTTTGAACTGATTTGCGCCCGCTGTATTCTGGTTGGTTTGCCTGTT
GACTGTCTTTTTACCCCTCGTGCCCTARGGAGAGGYGTTGGGGATCGTTTTTAGCCC
GCGAGGGACGGCCGGCCCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGYCTCCTCTGCG
AAGCCTGATMTTCCGCATCGGAGAGCGACGAGCCCCCTGCCGTTAAACCCCCAACTT
GTATGGGYTGACCTCTTAKCRAGTTGTAATATCCGCTGAGATTCTCATATCGTAAC
CCKGAGGAAGGATCATTACGAGSTTTCACTCCCAAACCATGTGAACATACCTATTGT
TGCTTCGCGGGATTGCCCGGCGCTCGTGTGCCCGGATCAGCGCCGCTAG

>JM14(TS4)

AAYGYGAGMGATGGTGGGTGAAGGGAGAATGGAARWGAAAAAAAAAWAATMAT
GAAAAACCCAAAAACAAAAAAAYAAAAATATAAAAAGAAAGGAAAGAWGGGGGAG
AGYTATTTTC

>JM15(ITS1)

TCTATACTCTGTTGCTTTGGCGGGGGCCCTTCCCCGCCCTTGACGCCGGGGGTCCCAC
GTCCCCGGRCCCGGACCTCCCCACTGCCTTTCGGGCCCTGATCAGGGGGACTGTCTG
AATATTATAAAAATTGTTGAACTTTAAATGAGGATCTCTTGGTTTGSCTCGAAAA
GCAACGCGGCGCAATGYGATTTSTAATATTAATTGATTAATTCAGTGAATCATTTC
TTTTGAATCACATTTTCGCTGCCTTCTTCATCCGGGGGGGAACCAAGAGATACCTTGTT
TAAAGTTTTTACGATTTTCTTGATWSTYGGACGTGSCMTCTTCGGGGAGSTGCACGA
AAGGCTKCGGCGRCGTCGGKCCGGGCGACGTGCGTCCCSCGCTTACTAGGTGGCYC
GGGARGGACCTGCGGAGGATGGTGTGTATAAAATCTAGGSTCGGATGATGGGGCGT

GAGGGCGGAGTCTCGSGCATGACTTAGCGCATGWCACGTACAGAAATCTTTACGAG
TGGGGCCTCCGCCAACTCACC

>JM15 (ITS4)

TTSSGKCGAGTCGRKKGTCTCTGATCGAGTCACCATCTGGAGTTGTTGGTGGTTTGAC
GGCCGGCCTCCGCCGGGACCCAATGCGAGCTTGCAAAAGAGACTTACTACGCASAA
GGCAACCGCGGGCGGGACCGCCACTGTATTTCTGGGGCCTACGGGGGTCGCGAAGACT
CGCCGTAGCGCCCCAACACCGACCCTGGGCTTCCCTGAGGAAACGGAGGTTTCGAGG
GTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCGGCAGATTACTGCCGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTGTTT
TTTGTTTTCAAATCAGAACTGTAATCCGCTGTAAAATTCAAGAGTTTGGTGCTGCCG
GCGGGAGGGGCATCGTCCTCTTTTCAGAGGGGCGCTGACCGACGCCGCCGAGGCAA
CAGAACATAAGGTAAGGTTTACAATGGGTTTGGAGTAGTAACTCTGTAATG

>JM16(ITS1)

GGGATCTCTGCCCCCGGTGCTTCCGAKCCCCGTGYGCAGGCGCCCGCTGACGATAG
GMTGAGGAKAGCTTTTGTATGCATCCTCGGGCGTGCCTAKATCTGGGCCAATTCCCC
ACCTGACCCCCGCGTTCCGAAAATCAATCAAACTTTCTCTCACAGAACKCGTGTTTCA
GGCTTCAGTGAAGAACGCGAGTGCATTGARACATTTAATGATAATCGGAAATCTGAY
GGAATTTTAAATCTTTGATTCTTTGCCCCCGGCCGTCTTCKGGGGGGCCTGTCTGT
CCGAGAATCATTTGGTTCTTTTCCCCTCCCTACGATAGGCGCCGGGAATCGGCCCAT
TTCAGAGCCCCGCCAGGAGRTATACTGAAGATTTTTTGGCTGCCYCTCCTGCGCGCTA
ATTGGTCCGGTGCTGCGGGAGCGCGGCGCGAYAGATTGCCGTAAGCRCTCAACTTTG
CACGTGAGATCGTCGTGATGAAGAGTTGAATACTCGCTGATGATCCCTCCGYCGTAC
GCCGKAAGGAAATAT

>JM16(ITS4)

No sequence

>JM17(ITS1)

GGGTAGGGGGACGGTTACCCAATGACATCCSKGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCT
CTGACAGGGGTGCCCCCAGAATASCAGGGGGGCTSAATGTGCKTTCGAARATTC SAT
RATTCASTGAATTCTGCAGTTCACATTCGCTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTGGGGAT
GCCGGAACCAAGAGATYCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCR TTCWRTCAMCTC
GTACTGCWCGCTGTCTRGACCGTGTTCTGTGKGGGGTSTCCGGCGGGCAYGGGCCCCG
GGGGGCAGAGGCGCCCCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACA
GTTTACAATASACACKGATGGGAGGTTGGGCCCATAGGACCCGCACTCGG

>JM17(ITS4)

TGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGC
CCGCCCCCGGGAGCCGGGGGGCGAAGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAG
CAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTAGC
TAATCTGCTCAGACTGCAATCTTCASACAGAGTTCAATGGTGTCTTCGGCGGGCGCG
GGCCCCGGGGCGGGTGCCCCCGGCGGACGTGAGGGGGGCCCGCCGAAGCAACAA
GGTAGAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCSTCACTCG

>JM18(ITS1)

ACATCGGGGGGTGAACGGGGCCCAACGTCCCACCCTKGTCTCTATGKCCTGTTGCTT
TGGSGGGGCCCCGGCGCCWTWTGGACGAGGGGGAACCCGTCTCCACCACCCGGAC
CTGCCCAATGCTTTGTGACCCTGATGAAGATCGGCTGACTCAATACTGAGAACATTG
TTGAGGTTTAAATGGCGTTCGGTTGTTTTGCGTCTCGGAAAGCCACGGGGCGCATGT
GCATTCAAATTCATTGATCTCGGAGTTTATCCTTCTCCTTTATATCATTTTCGCCCCG
TGCTTTCCCGTGCGCGGACCCTT

>JM18(ITS4)

CCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGC
AATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGA
TCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAKACTGCACGCTTTCAG
ACAGTGTTCTGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGGCACGGGCCCCGGGGGGCAGAGGCGCCCC
CCCGGCGGCGGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGTGTACAATAGACACGG
ATGGGGAGGTTGGGCCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCTG

>JM19(ITS1)

CCCAACACACAATCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGCCGCTCGGACTGGCATGCCCC
CGGAATACCAKGGGGCGCGATGTKYGTTSAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGC
AATTCACATTACTTATCGCATTTCTCTGSGKTCTTCATCYATGCSGGAACYWAGAGA
TCCGTTGTTGAAAKTKTTAACTGATTTASCTAATCTGCTCASAGTGCRRTCTTCACAC
AGAGTTCAATGGGGTCTGCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGSGGGTGCCCCCGGCGK
CCGTGAGGCGGGCCCCGCCGAGCAACARGGTAGAATAAACACGGGTGGGAGGTTGG
ACCCAGAGGGCCSTCACTCGTTRTGATCCTTCTGCAGGTRASCTACGGAAGT

>JM19(ITS4)

ACTCWACCCATGTGCACGTTCCAAACTGTTGGCGTTTTTCGGAATGTGCCCCCGGTGC
TTCCGATCCGCGTGTGCAAACCTCCCGCTGGAACAGGCTGCTGCCAGATTTTGTATGT
ATCTCGGGGCCGGCCCCCTATCAGGGCCAATTCCAAAAGTTGACCCCGCCGACCGGA
AATAAATCAGAACTATYGACTCYGGAACCTTGTTCAGAAATTCTGTGAAGAACGC
WGTGCATTGAAACATTTAATGATTCTCGGAATTCTGCRATTCTCATTACATCTTTCAT
TTCTCCTCGCGCCCCGCCGTCTTCKGGGGAGCCTGYCTGTCCGAGAGTCATTTGATT

CATTTTCCCCCTCCCTACGATAGGCGCCGGGATGGGTCCCATATTAGGGCCCCGCCAG
GCGGTATACWGCCGATTTTTAGGYTGCCCCTCCTGCGCGCTCATTGGCCCCGGTGCTG
CTAGTCACCCGGGTGATAAATCCCGCCAATCGCACAACTTCCTAACGTTACATCGT
CGTKATGAGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGYAGTMCACCTACGGAAAT
>JM20 (ITS1)

GGTTAAACCCTGATCCAAGTCAACCGCTTGTAATATAGCCTGTTGCTCCCCGGGGG
TCCTTCCCGAGCGAGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCAGACGGACGTCGCC
GCTGCCTTTCGGGCAGGTCCCCGGGGGGACCACACCCAACACACAAGCCGTGCTTG
AGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCAAT
GTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACA
ATTTTCATAATACTCAGACAGCCCATCTTCATCAAGGTTTCACAGAGCGCTTCGGCGG
GCGCGGGCCCGGGGACGTGCGTCCCCCGGCGACCAGGTGGCCCCGGTGGGCCCCGCC
AAAGCAACAGGTGTATAGAGACAAGGGTGGGAGGTTGGGCCGCGAGGGCCCCGCAC
TCGGTAATGATCCTTCCGCA

>JM20(ITS4)

GGTCCTTCCCGAGCGAGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCAGACGGACGTCG
CCGCTGCCTTTCGGGCAGGTCCCCGGGGGGACCACACCCAACACACAAGCCGTGCT
TGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCA
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTG
ACAATTTTCATAATACTCAGACAGCCCATCTTCATCAGGGTTTCACAGAGCGCTTCGG
CGGGCGCGGGCCCGGGGACGTGCGTCCCCCGGCGACCAGGTGGCCCCGGTGGGCCCC
GCCAAAGCAACAGGTGTATAGAGACAAGGGGGGGGAGGTTGGGCCGCGAGGGCCCC
GCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGCM

Apéndice 2. Datos primer muestreo de nemátodos entomopatogenos.

Localidad	Predio	Repetición	Población	Totales	Mortalidad
Isabela	China (Coleccion)	1	7425		10
Isabela	China (Coleccion)	2	5327		6
Isabela	China (Coleccion)	3	10265	23017	5
Isabela	Mandarina	1	9354		11
Isabela	Mandarina	2	5334		14
Isabela	Mandarina	3	6541	21229	13
Isabela	China (Valencia)	1	8762		10
Isabela	China (Valencia)	2	4691		8
Isabela	China (Valencia)	3	8943	22396	12
Isabela	China	1	5438		6
Isabela	China	2	7217		11
Isabela	China	3	7921	20576	9
Isabela	China (Nueva)	1	6203		7
Isabela	China (Nueva)	2	7978		12
Isabela	China (Nueva)	3	8136	22317	14
Adjuntas	Toronja	1	1984		3
Adjuntas	Toronja	2	1478		2
Adjuntas	Toronja	3	2198	5660	4
Adjuntas	Mandarina	1	3164		6
Adjuntas	Mandarina	2	2882		5
Adjuntas	Mandarina	3	2793	8839	6
Adjuntas	China	1	2458		6
Adjuntas	China	2	4215		5
Adjuntas	China	3	3102	9775	7
Adjuntas	Chironja	1	1264		5
Adjuntas	Chironja	2	4392		8
Adjuntas	Chironja	3	2158	7814	4
Adjuntas	China (Coleccion)	1	3854		7
Adjuntas	China (Coleccion)	2	5741		12
Adjuntas	China (Coleccion)	3	4962	14557	11

Apéndice 3. Datos segundo muestreo de nemátodos entomopatogenos.

Localidad	Predio	Repetición	Población	Totales	Mortalidad
Isabela	China (Coleccion)	1	4327		4
Isabela	China (Coleccion)	2	1916		2
Isabela	China (Coleccion)	3	6171	12414	5
Isabela	Mandarina	1	3129		3
Isabela	Mandarina	2	5953		5
Isabela	Mandarina	3	9584	18666	2
Isabela	China (Valencia)	1	4213		3
Isabela	China (Valencia)	2	10036		8
Isabela	China (Valencia)	3	2233	16482	2
Isabela	China	1	2119		2
Isabela	China	2	4268		4
Isabela	China	3	2435	8822	2
Isabela	China (Nueva)	1	8441		5
Isabela	China (Nueva)	2	9924		7
Isabela	China (Nueva)	3	4251	22616	3
Adjuntas	Toronja	1	8433		5
Adjuntas	Toronja	2	5721		4
Adjuntas	Toronja	3	5694	19848	4
Adjuntas	Mandarina	1	9624		7
Adjuntas	Mandarina	2	4652		3
Adjuntas	Mandarina	3	5361	19637	4
Adjuntas	China	1	2685		3
Adjuntas	China	2	7946		6
Adjuntas	China	3	10127	20758	8
Adjuntas	Chironja	1	8542		5
Adjuntas	Chironja	2	1639		2
Adjuntas	Chironja	3	8416	18597	7
Adjuntas	China (Coleccion)	1	2193		2
Adjuntas	China (Coleccion)	2	6358		5
Adjuntas	China (Coleccion)	3	6417	14968	5

Apéndice 8. Análisis de varianza de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Mortalidad	60	0.05	0.03	53.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32.27	1	32.27	3.06	0.0854
Localidad	32.27	1	32.27	3.06	0.0854
Error	611.13	58	10.54		
Total	643.40	59			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.67837

Error: 10.5368 gl: 58

Localidad	Medias	n	
Adjuntas	5.37	30	A
Isabela	6.83	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Apéndice 5. Datos primer muestreo de hongos.

Localidad	Predio	Repeticion	Total CH	Ufc/gss
Isabela	China (Coleccion)	1	60	1.0139
Isabela	China (Coleccion)	2	51	1.0118
Isabela	China (Coleccion)	3	47	1.0108
Isabela	Mandarina	1	53	1.0122
Isabela	Mandarina	2	40	1.0092
Isabela	Mandarina	3	54	1.0125
Isabela	China (Valencia)	1	95	1.0221
Isabela	China (Valencia)	2	82	1.019
Isabela	China (Valencia)	3	106	1.0247
Isabela	China	1	48	1.0111
Isabela	China	2	56	1.0129
Isabela	China	3	43	1.0099
Isabela	China (Nueva)	1	65	1.015
Isabela	China (Nueva)	2	58	1.0134
Isabela	China (Nueva)	3	60	1.0139
Adjuntas	Toronja	1	65	1.015
Adjuntas	Toronja	2	66	1.0153
Adjuntas	Toronja	3	96	1.0223
Adjuntas	Mandarina	1	73	1.0169
Adjuntas	Mandarina	2	69	1.016
Adjuntas	Mandarina	3	83	1.0192
Adjuntas	China	1	80	1.0185
Adjuntas	China	2	67	1.0155
Adjuntas	China	3	70	1.0162
Adjuntas	Chironja	1	88	1.0204
Adjuntas	Chironja	2	77	1.0178
Adjuntas	Chironja	3	68	1.0157
Adjuntas	China (Coleccion)	1	106	1.0247
Adjuntas	China (Coleccion)	2	97	1.0225
Adjuntas	China (Coleccion)	3	70	1.0162

Apéndice 6. Datos segundo muestreo de hongos.

Localidad	Predio	Repeticion	Total CH	Ufc/gss
Isabela	China (Coleccion)	1	71	1.0164
Isabela	China (Coleccion)	2	75	1.0174
Isabela	China (Coleccion)	3	80	1.0185
Isabela	Mandarina	1	54	1.0125
Isabela	Mandarina	2	47	1.0108
Isabela	Mandarina	3	64	1.0148
Isabela	China (Valencia)	1	68	1.0157
Isabela	China (Valencia)	2	72	1.0167
Isabela	China (Valencia)	3	70	1.0162
Isabela	China	1	45	1.0104
Isabela	China	2	50	1.0115
Isabela	China	3	59	1.0136
Isabela	China (Nueva)	1	66	1.0153
Isabela	China (Nueva)	2	78	1.0181
Isabela	China (Nueva)	3	60	1.0139
Adjuntas	Toronja	1	72	1.0167
Adjuntas	Toronja	2	51	1.0118
Adjuntas	Toronja	3	68	1.0157
Adjuntas	Mandarina	1	44	1.0101
Adjuntas	Mandarina	2	63	1.0146
Adjuntas	Mandarina	3	67	1.0155
Adjuntas	China	1	62	1.0143
Adjuntas	China	2	80	1.0182
Adjuntas	China	3	63	1.0146
Adjuntas	Chironja	1	63	1.0146
Adjuntas	Chironja	2	74	1.0171
Adjuntas	Chironja	3	73	1.0169
Adjuntas	China (Coleccion)	1	70	1.0162
Adjuntas	China (Coleccion)	2	65	1.015
Adjuntas	China (Coleccion)	3	59	1.0136

Apéndice 7. Análisis de varianza de la población de hongos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ufc/gss	60	0.13	0.10	0.32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9.0E-05	2	4.5E-05	4.17	0.0205
Localidad	6.6E-05	1	6.6E-05	6.11	0.0164
Muestreo	2.4E-05	1	2.4E-05	2.22	0.1418
Error	6.1E-04	57	1.1E-05		
Total	7.0E-04	59			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00170

Error: 0.0000 gl: 57

Localidad	Mediasn	
Adjuntas	1.02 30	A
Isabela	1.01 30	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00170

Error: 0.0000 gl: 57

Muestreo	Mediasn	
1.00	1.02 30	A
2.00	1.01 30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Apéndice 8. Mortalidad de larvas de *Diaprepes abbreviatus*, primer ensayo.

Treatment	Replicate	Apr-19-2009	Apr-22-2009	Apr-27-2009
Control (2 ml water)	#1	0	0	2
	#2	0	0	1
	#3	0	0	5
	#4	0	1	2
	#5	0	0	1
Heterorhabditis bacteriophora Oswego (10 IJ's/cm2)	#1	2	5	8
	#2	1	6	8
	#3	2	6	9
	#4	2	6	9
	#5	2	7	8
Rhabditis (10 IJ's/cm2)	#1	0	1	3
	#2	1	1	1
	#3	1	1	2
	#4	1	1	2
	#5	1	2	4
Heterorhabditis bacteriophora X Rhabditis (5 IJ's/cm2 each)	#1	3	6	9
	#2	1	4	9
	#3	3	7	10
	#4	1	6	7
	#5	1	6	7
Steinernema glaseri NJ43 (10 IJ's/cm2)	#1	2	3	4
	#2	0	0	6
	#3	2	4	5
	#4	0	2	7
	#5	4	6	9
Steinernema glaseri X Rhabditis (5 IJ's/cm2 each)	#1	2	3	6
	#2	0	2	6
	#3	0	1	5
	#4	1	5	7
	#5	2	7	7

Apéndice 9. Mortalidad de larvas de *Diaprepes abbreviatus*, segundo ensayo.

Treatment	Replicate	may-1-2009	may-4-2009	may-8-2009
Control (2 ml water)	#1	2	2	5
	#2	2	3	4
	#3	2	3	3
	#4	0	2	3
	#5	0	4	4
Heterorhabditis bacteriophora Oswego (10 IJ's/cm2)	#1	0	6	7
	#2	1	8	9
	#3	0	0	8
	#4	1	7	7
	#5	1	7	7
Rhabditis (10 IJ's/cm2)	#1	0	2	5
	#2	1	2	3
	#3	1	2	4
	#4	0	1	2
	#5	0	1	2
Heterorhabditis bacteriophora X Rhabditis (5 IJ's/cm2 each)	#1	2	7	8
	#2	0	7	8
	#3	0	7	7
	#4	1	6	6
	#5	0	6	6
Steinernema glaseri NJ43 (10 IJ's/cm2)	#1	0	3	6
	#2	0	5	7
	#3	2	3	4
	#4	0	3	4
	#5	1	2	5
Steinernema glaseri X Rhabditis (5 IJ's/cm2 each)	#1	0	3	7
	#2	1	3	6
	#3	0	4	8
	#4	0	3	4
	#5	1	4	8

Apéndice 10. Análisis de varianza de Interacción entre *Rhabditis* sp. nativo y NEP introducidos para el control de *Diaprepes abbreviatus*.

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 all dates 1
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control

Number of Observations Read	90
Number of Observations Used	90

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 all dates 2
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2.08288115	0.41657623	4.59	0.0009
Error	84	7.62574995	0.09078274		
Corrected Total	89	9.70863110			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.214539	-79.38887	0.301302	-0.379526

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	2.08288115	0.41657623	4.59	0.0009

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 all dates 3
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	84
Error Mean Square	0.090783

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.2187865	0.2625044	0.2883857	0.3067262	0.3208779

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.1765	15	Rhabd
A			
B	-0.2656	15	control

B	A				
B	A		-0.3137	15	Steiner
B	A				
B	A	C	-0.3748	15	S+R
B		C			
B		C	-0.5221	15	H+R
		C			
		C	-0.6244	15	Hetero

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 all dates 4
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
		Number of Observations Read 90
		Number of Observations Used 90

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 all dates 5
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	3.84192551	0.76838510	8.79	<.0001
Error	84	7.34279667	0.08741425		
Corrected Total	89	11.18472218			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.343498	-79.16576	0.295659	-0.373468

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	3.84192551	0.76838510	8.79	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 all dates 6
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	84
Error Mean Square	0.087414

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.2146891	0.2575882	0.2829849	0.3009818	0.3148686

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.0818	15	control

	A			
B	A	-0.1481	15	Rhabd
B				
B	C	-0.3846	15	S+R
B	C			
B	C	-0.3899	15	Steiner
	C			
	C	-0.6104	15	Hetero
	C			
	C	-0.6259	15	H+R

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 7
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
Number of Observations Read		30
Number of Observations Used		30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 8
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	3.25796703	0.65159341	15.71	<.0001
Error	24	0.99559266	0.04148303		
Corrected Total	29	4.25355969			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.765939	-31.23276	0.203674	-0.652116

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	3.25796703	0.65159341	15.71	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 9
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.041483

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.2658608	0.3216871	0.3553494	0.3794919	0.3982863

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.2253	5	control
A			
A	-0.2438	5	Rhabd
B	-0.6723	5	S+R
B			
B	-0.6948	5	Steiner
C	-1.0043	5	Hetero
C			
C	-1.0722	5	H+R

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 10
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
Number of Observations Read		30
Number of Observations Used		30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 11
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.63165708	0.32633142	12.25	<.0001
Error	24	0.63945296	0.02664387		
Corrected Total	29	2.27111003			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean		
0.718440	-46.56872	0.163230	-0.350513		
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	1.63165708	0.32633142	12.25	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 27 12
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.026644

Number of Means	2	3	4	5	6
-----------------	---	---	---	---	---

Critical Range 0.2130678 0.2578085 0.2847862 0.3041347 0.319197

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.0200	5	control
A			
B	-0.1204	5	Rhabd
B			
B	-0.3122	5	Steiner
C			
C	-0.3810	5	S+R
D			
D	-0.6235	5	H+R
D			
D	-0.6459	5	Hetero

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 22 13
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
Number of Observations Read		30
Number of Observations Used		30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 22 14
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.63165708	0.32633142	12.25	<.0001
Error	24	0.63945296	0.02664387		
Corrected Total	29	2.27111003			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.718440	-46.56872	0.163230	-0.350513

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	1.63165708	0.32633142	12.25	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 22 15
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha 0.05

	Error Degrees of Freedom	24
	Error Mean Square	0.026644
Number of Means	2	3
Critical Range	0.2130678	0.2578085
	4	5
	0.2847862	0.3041347
	6	0.319197

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.0200	5	control
A			
B	-0.1204	5	Rhabd
B			
B	-0.3122	5	Steiner
C			
C	-0.3810	5	S+R
D			
D	-0.6235	5	H+R
D			
D	-0.6459	5	Hetero

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 19 16
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control

Number of Observations Read	30
Number of Observations Used	30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 19 17
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.12874778	0.02574956	2.75	0.0422
Error	24	0.22480150	0.00936673		
Corrected Total	29	0.35354928			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.364158	-82.17470	0.096782	-0.117776

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	0.12874778	0.02574956	2.75	0.0422

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 1 apr 19 18
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis

but not under partial null hypotheses.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.009367

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.1263319	0.1528595	0.1688551	0.1803272	0.1892579

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	0.00000	5	control
A	-0.08013	5	Rhabd
A	-0.10058	5	S+R
A	-0.16285	5	Steiner
A	-0.18112	5	Hetero
A	-0.18198	5	H+R

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 1 19
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
	Number of Observations Read	30
	Number of Observations Used	30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 1 20
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.02207547	0.00441509	0.71	0.6229
Error	24	0.14956470	0.00623186		
Corrected Total	29	0.17164017			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.128615	-124.1036	0.078942	-0.063610

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	0.02207547	0.00441509	0.71	0.6229

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 1 21
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.006232			
Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.1030453	0.124683	0.1377302	0.1470876	0.1543722

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.04007	5	Rhabd
A			
A	-0.04007	5	S+R
A			
A	-0.06010	5	Hetero
A			
A	-0.06031	5	H+R
A			
A	-0.06031	5	Steiner
A			
A	-0.12081	5	control

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 4 22
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
Number of Observations Read		30
Number of Observations Used		30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 4 23
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2.24090976	0.44818195	15.97	<.0001
Error	24	0.67371082	0.02807128		
Corrected Total	29	2.91462058			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean		
0.768851	-36.13540	0.167545	-0.463659		

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	2.24090976	0.44818195	15.97	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 4 24
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

	Alpha	0.05			
	Error Degrees of Freedom	24			
	Error Mean Square	0.028071			
Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.2187007	0.2646242	0.2923152	0.3121752	0.3276357

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.1609	5	Rhabd
A			
A	-0.2847	5	control
A			
A	-0.3278	5	Steiner
A			
A	-0.3474	5	S+R
B			
B	-0.7226	5	H+R
B			
B	-0.9385	5	Hetero

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 9 25
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trtmnt	6	H+R Hetero Rhabd S+R Steiner control
Number of Observations Read		30
Number of Observations Used		30

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 9 26
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: mortalit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.23287287	0.24657457	10.36	<.0001
Error	24	0.57133241	0.02380552		
Corrected Total	29	1.80420529			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mortalit Mean
0.683333	-25.23926	0.154290	-0.611311

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trtmnt	5	1.23287287	0.24657457	10.36	<.0001

Nematodes versus Diaprepes 2009 arcsin transformed Trial 2 may 9 27
06:36 Tuesday, September 1, 2009

The GLM Procedure

Student-Newman-Keuls Test for mortalit

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate under the complete null hypothesis but not under partial null hypotheses.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 24
Error Mean Square 0.023806

Number of Means	2	3	4	5	6
Critical Range	0.2013993	0.2436898	0.2691901	0.287479	0.3017164

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	trtmnt
A	-0.32850	5	Rhabd
A			
A	-0.39120	5	control
A			
B	A	5	Steiner
B			
B	C	5	S+R
B	C		
B	C	5	H+R
C			
C	-0.87465	5	Hetero