

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD INFECTIVA
DEL NEMATODO *Steinernema sp.* BAJO
DIFERENTES SUSTRATOS ORGANICOS PARA EL
CONTROL DE CHISA *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae)**

**LAYDI VIVIANA CASTILLO BARCO
DAYSI JHOANA OBANDO ALVAREZ**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
PASTO
2008**

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD INFECTIVA
DEL NEMATODO *Steinernema sp.* BAJO
DIFERENTES SUSTRATOS ORGANICOS PARA EL
CONTROL DE CHISA *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae)**

**LAYDI VIVIANA CASTILLO BARCO
DAYSI JHOANA OBANDO ALVAREZ**

**Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Ingeniero Agrónomo**

**Presidente de Tesis:
CLAUDIA SALAZAR GONZALEZ I.A. M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
PASTO
2008**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

I.A. M. Sc. Claudia Salazar González
Presidente de Tesis

I.A. M. Sc. Carlos Betancourth García
Jurado Delegado

Ph. D. Rolando Titto Bacca Ibarra
Jurado

I. A. M. Sc. Luís Alfredo Molina
Jurado

San Juan de Pasto, Junio de 2008

DEDICO A:

Dios.

A mi madre María Lidia Alvarez Oviedo.

A mis hermanos Oscar y Karol.

A mis familiares.

DAYSÍ JHOANA OBANDO ALVAREZ.

DEDICO A:

A mis padres: Jesús Manuel y Maria Melania

A mis hijos: Maria José Mora y Ricardo Andrés Castillo

A mis hermanos

A mis familiares.

LAYDI VIVIANA CASTILLO BARCO

AGRADECIMIENTOS

Los autores presentan agradecimientos a:

CLAUDIA SALAZAR GONZÁLEZ, Ingeniera Agrónoma, M. Sc., Presidente de esta investigación, docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, por su acertada dirección, confianza, colaboración y por las enseñanzas personales y técnicas.

CARLOS BETANCOURTH GARCÍA, Ingeniero Agrónomo, M. Sc., por su colaboración y enseñanzas.

ROLANDO TITTO BACCA IBARRA, Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Ph. D., por su colaboración y disponibilidad.

LUÍS ALFREDO MOLINA VALERO, Ingeniero Agrónomo, M. Sc., por su colaboración y disponibilidad.

BENJAMÍN SAÑUDO SOTELO, Ingeniero Agrónomo. por su colaboración y sus enseñanzas.

ALVARO CASTILLO MARIN, Ingeniero Agrónomo, Esp., secretario de la Facultad de Ciencia Agrícolas. Universidad de Nariño, por su grata colaboración y amistad.

Todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de la presente investigación.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. REVISIÓN DE LITERATURA	22
1.1 DISTRIBUCIÓN	22
1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA CHISA <i>Astaena sp.</i>	22
1.2.1 Clasificación taxonómica	22
1.2.2 Descripción y hábitos de la chisa	23
1.2.2.1 Huevo	23
1.2.2.2 Larva	23
1.2.2.3 Pupa	24
1.2.2.4 Adulto	24
1.3 DAÑOS	25
1.4 HOSPEDANTES	26
1.5 CONTROL BIOLÓGICO	26
1.5.1 Control con hongos entomopatógenos	26
1.5.2 Control con bacterias entomopatógenas	27
1.5.3 Control con nematodos entomopatógenos	27
1.5.3.1 Aspectos taxonómicos	28
1.5.3.2 Descripción del nematodo <i>Steinernema sp.</i>	28
1.5.3.3 Ciclo de vida del nematodo <i>Steinernema sp.</i>	29

1.5.3.4 Bacteria mutualista	31
1.5.3.5 Síntomas de larvas de insectos afectadas por <i>Steinernema sp.</i>	34
1.5.3.6 Experiencia de control de diferentes insectos con <i>Steinernema sp.</i>	34
1.5.3.7 Ecología y dispersión	37
1.5.3.8 Localización, penetración y proceso de infección	44
1.5.3.9 Cultivo de nematodos	45
1.5.3.10 Extracción de nematodos	48
1.6 SUSTRATOS ORGÁNICOS	50
1.6.1 Lombricompost	50
1.6.2 Gallinaza	50
1.6.3 Compost	51
1.6.4 Consideraciones para la inoculación de nematodos entomopatógenos en el suelo	51
2. DISEÑO METODOLÓGICO	54
2.1 LOCALIZACIÓN	54
2.2 RECOLECCIÓN DEL SUELO INFESTADO	54
2.3 RECOLECCIÓN DEL SUELO LIBRE DE NEMATODOS	54
2.4 RECOLECCIÓN DE LARVAS PARA LA EVALUACIÓN	54
2.5 MULTIPLICACIÓN DEL NEMATODO <i>Steinernema sp.</i>	55
2.6 DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN DE NEMATODOS EN EL SUELO INFESTADO	57
2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	58
2.8 VARIABLES DE RESPUESTA	59

2.8.1 Evaluación de la mortalidad	59
2.8.2 Evaluación de los sustratos orgánicos	60
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1 DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS EN LARVAS	67
3.2 VARIABLES DE RESPUESTA	65
3.2.1 Evaluación de la mortalidad	65
3.2.2 Evaluación de los sustratos orgánicos	71
4. CONCLUSIONES	74
5. RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad corregida de cuatro concentraciones de abono orgánico y suelo con *Steinernema sp.* (Rhabditida: Steinernematidae) en el control de *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae) en condiciones de laboratorio. Datos transformados mediante la fórmula $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{X}$.

66

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclo de vida general de los nematodos entomopatógenos (Ehler 2001).	31
Figura 2. Trampas de White.	56
Figura 3. Nematodos entomopatógenos en el suelo.	58
Figura 4. Larvas de <i>Astaena sp.</i> en los recipientes plásticos.	59
Figura 5. Larvas de <i>Astaena sp.</i> sanas.	61
Figura 6. Larvas de <i>Astaena sp.</i> infectadas con <i>Steinernema sp.</i>	61
Figura 7. Juveniles infectivos de <i>steinernema sp.</i>	62
Figura 8. <i>Steinernema sp.</i> a. Macho, b. hembra.	62
Figura 9. Larva disectada.	63

GLOSARIO

ANHIDROBIOSIS: seres vivos en cuya composición no entra el agua, o que han perdido la que tenían.

ANOXIA: ausencia de oxígeno en la sangre.

ANTIBIÓTICO: sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida.

BACTERIÓFAGO: virus que se desarrolla en las bacterias, multiplicándose dentro de ellas y destruyéndolas.

BURSA: se encuentra en la región de la cloaca y son dos aletas formadas por la cutícula, que vistas de lado parecen un cojín, generalmente sirven para proteger a la cloaca y afianzarse a la hembra durante la cópula.

CEPA: clase de microorganismos que se derivan de otros con caracteres morfológicos específicos.

DIDELFO: hembras caracterizadas principalmente por tener en el abdomen una bolsa donde están contenidas las mamas y donde permanecen encerradas las crías durante el primer tiempo de su desarrollo.

FAGOCITO: cada una de las células que se hallan en la sangre y en muchos tejidos animales, capaces de apoderarse, mediante la emisión de pseudópodos, de bacterias, cadáveres celulares y, en general, de toda clase de partículas nocivas o inútiles para el organismo, incluyéndolas en su citoplasma y digiriéndolas después.

FAGOCITOSIS: mecanismo durante el cual los fagocitos destruyen los microorganismos nocivos en la célula.

HEMOCELE: cavidad corporal formada por la expansión del sistema vascular.

HEMOCITOS: células de la sangre

HEMOLINFA: sustancia nutritiva de los invertebrados. Este plasma desempeña en ellos un papel similar al de la sangre en los vertebrados.

HOSPEDANTE: vegetal o animal en cuyo cuerpo se aloja un parásito.

INFECCIÓN: penetración y desarrollo dentro de un organismo, de microbios patógenos que permanecen localizados y vierten sus toxinas en la sangre. Se puede producir por inhalación, por ingestión, por medio de heridas, etc.

INOCULAR: introducir un microorganismo que genera una enfermedad en un ser vivo o sembrarlo en un suelo o en un medio de cultivo.

LECITINA: compuesto de glicerina y ácido fosfórico, que se encuentra en células animales y vegetales y que se utiliza como reconstituyente. Es soluble en alcohol y éter.

LIPASA: cada una de las enzimas pertenecientes al grupo de las esterazas, que disocian las grasas en ácidos grasos y glicerina.

LÍPIDO: cada uno de los compuestos orgánicos de la familia de las grasas y otras sustancias semejantes por su composición o propiedades que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.

MELANINA: pigmento de color negro o pardo negrusco, existente en forma de gránulos en el protoplasma de ciertas células.

PATÓGENO: que es capaz de originar y desarrollar una enfermedad.

QUIMIOTAXIS: respuesta del nematodo a un gradiente químico.

SEPTICEMIA: afección generalizada producida por la presencia en la sangre de microorganismos patógenos o de sus toxinas.

SIMBIOSIS: Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies que se favorecen mutuamente en su desarrollo.

TOXINA: sustancia venenosa de origen biológico, elaborada por agentes patógenos, capaz de causar en el organismo efectos tóxicos.

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño para determinar la susceptibilidad de las larvas de tercer ínstar de chisa *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae), al ser infectadas con una cepa nativa de *Steinernema sp.* bajo diferentes sustratos orgánicos (gallinaza, lombricompost y compost).

Se realizó la multiplicación del nematodo en recipientes de plástico con suelo infestado con *Steinernema sp.* en donde se colocó larvas de chisa; inicialmente se colocó 10 larvas de chisa por cada 1000 g de suelo con inóculo, hasta lograr la muerte total de las larvas, luego se colocó 20 larvas de chisa sanas por cada 1000 g de suelo con inóculo y cuando se obtuvo muerte total de las larvas se mezcló el suelo con igual proporción de suelo libre, este proceso propuesto por Sañudo; et al. (2003) continuó hasta obtener la cantidad suficiente de suelo con inóculo con mortalidad total de larvas de chisa.

El experimento se llevo a cabo en recipientes de plástico con capacidad de 1 kg. A cada recipiente se le agregó la mezcla correspondiente de abono orgánico más suelo con inóculo y 10 larvas de chisa. A cada tratamiento se le realizó cinco repeticiones. A mayor concentración de la cepa nativa *Steinernema sp.* mayor porcentaje de mortalidad de las larvas; es por esto, que el suelo con inóculo (testigo con inóculo) con 2500 a 3000 nematodos produjo una mortalidad promedio de 74.31% y la concentración 500 g de abono orgánico más 500 g de suelo con inóculo con 1250 a 1500 nematodos ocasiono una mortalidad promedio de 71.50% sin presentar diferencias significativas entre ellas, seguidas por la concentración 700 g de abono orgánico más 300 g de suelo con inóculo con 750 a 900 nematodos que produjo una mortalidad promedio de 59.12% y la concentración 900 g de abono orgánico más 100 g de suelo con inóculo con 250 a 300 nematodos ocasiono una mortalidad promedio de 52.52%.

Los abonos orgánicos se comportaron de la misma manera con cualquiera de las concentraciones, por lo tanto, con cualquiera de ellos se va a obtener buena capacidad infectiva de los nematodos sobre las larvas de *Astaena sp.*, existiendo en general una relación directamente proporcional entre la concentración de nematodos y la mortalidad de las larvas, pues a medida que aumentó la concentración de nematodos infectivos, se incrementó la mortalidad de las larvas de chisa.

PALABRAS CLAVE: larvas, nematodos, inóculo, abono orgánico, mortalidad.

ABSTRACT

This investigation was carried in the laboratory of microbiology of Nariño University to determine the susceptibility of the white grub in third instar of chisa *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae), the larvae have become infected by a native nematode of *Steinernema sp.* under different organics grounds (gallinaza, lombricompost and compost) the nematode was isolated from soil of Nariño lake at the Ospina and Mapachico path.

It was carried the nematode multiplication the ground has become infected with *Steinernema sp.* in plastics vassels where put in the larvae, first ten larvae until get death all them. Then put in twenty healthy larva's each 1000 g of infect ground end when we got all larvae death mix it whit a ground and when we got all larva's death mix it whit a ground whit out infection, according to established procedure by Sañudo; et al. (2003) went on until get 28.5 Kg of infect ground whit full mortality. Each 48 hours take the death larvae infected whit nematodes, they have laid in a white chamber for to extract the nematodes and again put them in the infect ground whit healthy larvae.

The entomopathogenic caused death in larvae of third instar of *Astaena sp.* and showed different mortality percentages, all deferent content of nematode in each treatment; it did not matler the organic fertilizer used. To bigger content of *Steinernema sp.* native cep the mortally of larvae will be bigger, so that 1 kg infect ground of nematodes (baton of nematodes) 2500 to 3000 nematodes and fertilizer 500 g plus 500 g infect ground 1250 to 1500 nematodes were the most outstanding, the next was organic fertilizer 700 g plus infect ground 300 g, 750 to 900 nematodes, and 900 g of organic fertilizer plus 100 g of infect ground, 250 to 300 nematodes.

This research suggest that the specie of nematode evaluated represent a not toxic alternative, not even wastes, like control biological agent in larvae of *Astaena sp.* in to handle of plague that make up the program, recommend to *Steinernema sp.* par to next research.

KEY WORDS: white grubs, nematodes, infect, fertilizer, mortality

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Nariño se caracteriza por ser una de las zonas productoras de diversos cultivos como: zanahoria, arveja, papa, maíz y cereales de clima frío, debido al mal manejo que se le ha dado a los suelos surge como consecuencia un incremento de plagas y enfermedades que representan pérdidas en la producción agrícola¹.

250 larvas de chisa/m causan daños hasta del 100% en cultivos de papa y trigo en fincas de minifundios en Yacuanquer y Ospina, esta problemática afecta regiones agrícolas de 1552 hectáreas. Se confirmó que las poblaciones de *Ancognatha scarabaeiodes* a niveles altos de 50 larvas/m no afecta la producción, mientras que la presencia de 19 a 15 larvas/m de tercer ínstar de *Astaena sp.* ocasionan un daño severo en cultivos de maíz y zanahoria².

Actualmente dentro de las plagas que afectan cultivos, las chisas, gallinas ciegas, mojojeyes, cuzos o morrongos han venido causando problemas en varias regiones del departamento, especialmente las especies *Ancognatha sp.* y *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae), su importancia radica en el daño que efectúan al sistema radical, que se representa en el debilitamiento y pérdida de la planta que conlleva así a una disminución consecuente en los rendimientos. En cultivos como papa, se han registrado pérdidas hasta del 82% y en cereales las pérdidas ascienden al 91%³.

La inversión que los agricultores hacen en abonos y fertilizantes, semilla, protección fitosanitaria en general y mano de obra se ve afectada en muchos casos por los daños que ocasionan las larvas o adultos melolonthidos que trozan las plantas o consumen las raíces. Algunas veces, los daños son notorios al momento de la cosecha como ocurre en tubérculos, bulbos nabos en los cuales el follaje no manifiesta el daño hecho por la chisa en sitios de almacenamiento de nutrientes⁴.

¹ PEÑA, L. Investigación para el Mecen fincas de minifundios en Yacuanquer y Ospina. Proyecto PRONATA. San Juan de Pasto: Corpoica, 2001. 10 p.

² Ibid., p. 10.

³ RUIZ, N. y PUMALPA, N. Conozca la chisa y su control. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario ICA, 1989. 2 p. (Plegable de divulgación; no. 217).

⁴ FERNÁNDEZ, E.; ARTEAGA, E. y PÉREZ, M. Utilización de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas. Ciudad de la Habana, Cuba: Laboratorio de nematología INISAV, 1998. 2 p.

En los últimos años las chisas se han incrementado considerablemente, debido al uso indiscriminado de insecticidas que afectan la entomofauna benéfica encargadas de mantener un equilibrio ecológico natural. Por lo tanto, existe la necesidad de reevaluar el método químico convencional y buscar otra alternativa de control para lograr un manejo integrado que no interfiera con la acción de los insectos benéficos que existen en el agroecosistema ⁵.

Dentro de las posibles estrategias, el control de insectos con nematodos entomopatógenos facilita la posibilidad de aislar y manipular inóculo y obtener fundamentos técnicos necesarios para trabajos con agentes biocontroladores en el campo, con el fin de contribuir al control de la chisa, disminuir riesgos de contaminación ambiental, reducir los costos de control y hacer una manipulación del ambiente aplicándolos cuando las condiciones de clima y suelo faciliten la dispersión y sobrevivencia de los nematodos biocontroladores⁶.

De las relaciones existentes en la naturaleza entre insectos y nematodos, la patogénica es característica de una alta especialización, debido a que en ella solamente los nematodos han desarrollado la característica de transportar e introducir una bacteria simbiote con ellos, dentro de la cavidad del cuerpo de los insectos, son además los únicos patógenos de insectos con un amplio rango de hospedantes y pueden ser reproducidos masivamente en medios sólidos o líquidos⁷.

Su utilidad práctica para el control de numerosos insectos plaga así como su inocuidad ante otros animales y el medio los ha convertido en una defensa de la protección fitosanitaria para la siembra de cultivos como: papa, zanahoria, trigo, cebada, cebolla, entre otros, principalmente como parte del manejo integrado de plagas⁸.

⁵ PEÑA, L. y LUCERO, A. Manejo Integrado de la chisa en el Departamento de Nariño. San Juan de Pasto: Corpoica, 2003. 3 p.

⁶ Ibid., p. 3.

⁷ POINAR JUNIOR, G. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC press, 1990. 24 p.

⁸ FERNÁNDEZ; ARTEAGA y PÉREZ, Op. cit., p. 1.

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo tiene como objetivos:

- Contribuir y ampliar el conocimiento acerca del control biológico para la chisa *Astaena sp.* utilizando el nematodo *Steinernema sp.*
- utilizar la metodología artesanal para la multiplicación del nematodo en el suelo.
- Describir y determinar los síntomas de infectividad que presenta el nematodo *Steinernema sp.*

1. REVISIÓN DE LITERATURA

Como chisa en nuestro medio, se conoce el estado larval de coleópteros de la familia Melolonthidae, que viven en el suelo a diferentes profundidades⁹.

En Nariño las especies más abundantes son *Ancognatha scarabaeoides* Burmeister y *Astaena sp.* se caracterizan por ocasionar daños en el sistema de producción de cultivos como leguminosas, hortalizas y cereales. Las larvas son rizófagas, es decir atacan la raíz de diferentes cultivos y otras son saprófagas, es decir se alimentan de materia orgánica en descomposición¹⁰.

1.1 DISTRIBUCIÓN

Su habitat son las regiones de clima frío. En el departamento de Nariño, la plaga se ha encontrado en los municipios de Sapuyes, Tuquerres, Iles, Pasto donde se encuentran poblaciones abundantes de *Ancognatha scarabaeoides* y *Astaena sp.*, en Ospina y Yacuanquer predominan larvas de *Astaena sp.*¹¹.

1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA CHISA *Astaena sp.*

1.2.1 Clasificación taxonómica. La clasificación taxonómica es:

División:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Coleoptera
Familia:	Melolonthidae
Subfamilia:	Melolonthinae
Género:	<i>Astaena</i>
Especie:	<i>Astaena</i> ¹²

⁹ MORENO, J. Manejo Integrado del cultivo de papa. Tibaitata: Corpoica, 2000. 122 p.

¹⁰ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 4.

¹¹ RUIZ y PUMALPA, Op. cit., p. 3.

¹² RESTREPO, H. y LÓPEZ-AVILA. Especies de chisas (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia. Corpoica, MIP Bogota: Produmedios, 2001. 15 p.

1.2.2 Descripción y hábitos de la chisa. La chisa tiene un ciclo de vida completo, es decir pasa por los estados de: huevo, larva, pupa y adulto y puede durar aproximadamente un año hasta año y medio dependiendo de la especie¹³.

1.2.2.1 Huevo. La hembra de chisa penetra en el suelo después de la copula y deposita los huevos individualmente o en grupos de 50 huevos a manera de racimo, las hembras pueden ovipositar de 200 a 300 huevos, las posturas se pueden observar a simple vista al remover el suelo¹⁴.

Los huevos de *Astaena sp.* son de color blanco perla, casi esféricos, miden en promedio 1,5 mm de largo por 1,1 mm de ancho y durante la incubación aumentan de tamaño. Los huevos se pueden encontrar en abril y mayo y duran en promedio un mes¹⁵.

1.2.2.2 Larva. Las larvas recién nacidas miden unos 5 mm de largo, son de color blanco translucido con la cabeza de color amarillo, presentan cuerpo encorvado y cubierto de pelos largos, poseen mandíbulas grandes y tienen tres pares de patas bien diferenciadas y funcionales, las larvas de *Astaena sp.* son rizófagas debido a que se alimenta de la raíz de numerosos cultivos. Para poder diferenciar especies al nivel de larvas se utilizan las características de ráster, la abertura anal y el color de la cabeza¹⁶.

Las larvas de *Astaena sp.* en su desarrollo pasan por tres instares y su tamaño varía con la edad; se ubican principalmente en el área de raíces de la planta donde permanecen de seis a siete meses (mayo – noviembre). Las larvas de primer instar tienen una duración de 30 días, se pueden encontrar a 10 cm de profundidad y se alimentan de materia orgánica; las de segundo instar tienen una duración de 60 días, se localizan entre 20 y 25 cm de profundidad y se alimentan de raíces; las de tercer instar duran aproximadamente 120 días y se localizan entre 25 y 30 cm de profundidad y se alimentan de raíces de plantas. Este último es el instar más voraz y el principal responsable del daño. Las larvas tienen forma de “c” y cuando están completamente desarrolladas miden 2,5 cm de longitud, su cuerpo es de color blanco sucio con la cabeza de color amarillo marrón¹⁷.

¹³ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 5.

¹⁴ MORENO, Op. cit., p. 124.

¹⁵ RUIZ y PUMALPA, Op. cit., p. 4.

¹⁶ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 5.

¹⁷ RUIZ y PUMALPA, Op. cit., p. 4

1.2.2.2 Pupa. La pupa de *Astaena sp.* es de tipo exarata o descubierta caracterizada por la presencia externa de los apéndices del futuro adulto su color es ámbar a café claro, esta protegida con una cámara pupal elaborada con tierra y excretas, construida mediante compactación que la larva hace con movimientos circulares. Las pupas se forman a partir de diciembre y se localizan en profundidades entre 70 cm y 1 m., donde permanecen hasta la llegada de las lluvias; es decir, un periodo de cuatro meses. Estudios realizados en laboratorio indican que el estado pupal dura aproximadamente 45 días; el adulto emergido permanece en la cámara pupal hasta que las condiciones ambientales le permitan salir. Si hay humedad suficiente en el suelo, el adulto abandona la cámara pupal, atraviesa el perfil del suelo y sale a volar. Si no hay humedad suficiente los adultos permanecen en la cámara pupal hasta la llegada de las lluvias¹⁸.

1.2.2.4 Adulto. los adultos de las chisas son cucarones cuyo tamaño y color varía de acuerdo con la especie, los escarabajos de la familia Melolonthidae tienen el cuerpo duro de forma ovalada o elongada, usualmente convexos; el tarso tiene 5 segmentos, las antenas son lameladas y poseen de 8 a 11 segmentos (los últimos 3 segmentos están expandidos). Las tibias frontales son dilatadas y presentan un diente o espolón¹⁹.

El adulto de *Astaena sp.* se caracteriza por presentar una forma rectangular y alargada, su tamaño varía entre 1 y 1,2 cm de longitud, el cuerpo presenta una coloración marrón, la cabeza es un poco más oscura que el resto del cuerpo. Presenta dimorfismo sexual, las hembras son de tamaño mayor que los machos, los tarsos de las patas anteriores en las hembras son delgados y alargados y los tarsos de los machos son especialmente engrosados curvados y adaptados para agarrar²⁰.

los adultos son de hábitos nocturnos y son atraídos por la luz artificial, especialmente luz negra y amarilla, estos emergen del suelo y vuelan durante las últimas horas de la tarde y las primeras horas de la noche al final de abril y comienzos de mayo cuando se inicia la temporada de lluvias, durante los meses de octubre y noviembre se presenta otra emergencia de adultos, un poco menos abundante que la primera²¹.

¹⁸ LONDOÑO, M. La Chisa o Mojoy: un modelo de Investigación entomológica. En: Cuarto seminario técnico regional. Rionegro, Antioquia: Corpoica. Vol. 4, No. 4 (ago. 1998); 50 p.

¹⁹ RESTREPO, H. y LÓPEZ-AVILA, Op. cit., p. 16.

²⁰ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 5 y 6

²¹ MORENO, Op. cit., p. 123

1.3 DAÑOS

En *Astaena sp.* el daño es causado por las larvas de tercer ínstar y dependiendo de la edad del cultivo, el ataque se manifiesta de tres formas:

- Como trozador de plántulas; en este caso las larvas cortan la plántula a la altura del cuello de la raíz, debajo de la superficie del suelo; causando amarillamiento de la planta pero esta no se cae.
- Como comedores de raíces; caso en el cual reduce el sistema radical en más del 70%, por lo cual las plantas pierden anclaje, el grano se vanea y hay volcamiento de la planta para el caso de cereales; además perforan los tubérculos de papa.
- En pastos mejorados tales como Manawa, Tetralite y los Raigras se produce un amarillamiento por que una vez aflojada la tierra por el insecto, el pisoteo del ganado causa desprendimiento del cespedon y las raíces no vuelven a sujetarse, lo que no sucede con el Kikuyo que posee un sistema radical profundo que le permite recuperarse fácilmente después de un ataque, el cual no es uniforme en todo el lote, sino que se manifiesta por parches²².

Estos daños son especialmente severos en los cultivos localizados en los lotes nuevos, que anteriormente fueron dedicados a pastos o a cereales menores.

El daño en tubérculo (formación de huecos grandes irregulares) causado por la chisa se clasifica en 4 grados: Grado 1: 0-25%, Grado 2: 26-50%, Grado 3: 51-75%, Grado 4: 76-100%²³.

Cuando se observa el daño causado por chisa en papa, evaluado al momento de la cosecha, se ha podido detectar daños en el 50% de los tubérculos (incidencia) con deterioros entre 26 y 100% del tubérculo (severidad). Estos datos dan una idea sobre la importancia económica de la chisa en la producción de papa ya que los tubérculos con severidades menores al 25% pueden ser camuflados para su comercialización, cuando la severidad es superior al 26% se presenta problemas en cuanto a la comercialización del producto, ocasionando una reducción en los ingresos del productor²⁴.

²² RUIZ y PUMALPA, Op. cit., p. 3.

²³ MORENO, Op. cit., p. 124.

²⁴ Ibid., p. 124.

1.4 HOSPEDANTES

Los principales hospedantes son pastos, en cuyo caso el daño se presenta en parches bien definidos, de color amarillento al principio y luego se secan, también afectan otros cultivos como cereales menores, maíz, fresa, fríjol, papa y ornamentales de clima frío²⁵.

Los adultos se vuelven activos volando durante la noche y alimentándose del follaje de los cultivos antes mencionados y hojas de otras plantas. A los primeros indicios de amanecer ellos regresan con rapidez al suelo.

1.5 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico ha existido en el medio ambiente y utiliza recursos naturales para mantener las poblaciones de especies dañinas en cultivos por debajo de niveles que causen daño económico, pero el uso indiscriminado de insecticidas los ha exterminado. Sin embargo, en la actualidad este control es usado como una estrategia de manejos integrados de enfermedades, patógenos e insectos plaga. No obstante, el manejo de plagas debe hacerse combinando estrategias que permitan reducir las poblaciones del insecto que causa problemas. Para ello, el control biológico deberá ser una de las estrategias, la cual combinada con otras, permitirá lograr las metas de reducción poblacional. Los agentes de control biológico de las chisas por lo tanto deberán ser combinados con algunas prácticas culturales y sobre todo, con una actitud diferente por parte de los productores rurales²⁶.

1.5.1 Control con hongos entomopatògenos. dentro de las estrategias posibles, el control biológico con hongos entomopatògenos ofrece buenas alternativas para el manejo integrado de chisas, debido a que estos microorganismos en condiciones ambientales favorables reducen las poblaciones de la plaga hasta en un 50%, este control no favorece ningún riesgo tóxico para otras formas de vida²⁷.

²⁵ RUIZ y PUMALPA, Op. cit., p. 4.

²⁶ LONDOÑO, Op. cit., p. 51.

²⁷ PAZOS, I. y CHECA, E. Reconocimiento e identificación de hongos entomopatògenos en chisas *Ancognatha sp.* y *Astaena sp.* (Coleoptera: Scarabaeidae) en la zona cerealera del Departamento de Nariño. Pasto, Colombia, 1990, 56 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Actualmente, se están utilizando hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* los cuales atacan a las chisas en cualquier etapa de su desarrollo (larva, pupa y adulto). Los hongos son aislados de ambientes naturales y multiplicados en el laboratorio para ser nuevamente aplicados en lugares donde la chisa es un problema. El insecto afectado presenta disminución de su movilidad y finalmente muere²⁸.

1.5.2 Control con bacterias entomopatógenas. Aunque existen muchas especies de bacterias asociadas con insectos, son pocas con características de patogenicidad para su utilización en el control biológico de plagas. En la mayoría de las infecciones las bacterias llegan al hemocele a través del tracto digestivo. Esto es válido especialmente para todas las especies del género *Bacillus sp.* en el que las esporas sirven como agentes infecciosos²⁹.

La bacteria más utilizada para controlar la chisa es *Bacillus popilliae*, con la cual se ha obtenido excelentes resultados en el control de *Popillia japonica*. La esporulación no puede ser inducida en medios artificiales. La producción industrial depende de la colección de larvas vivas en el campo y su inoculación³⁰.

1.5.3 Control con nematodos entomopatógenos. Los nemátodos entomopatógenos son utilizados como insecticidas biológicos contra insectos perjudiciales de plantas, desde finales de los años 80, el interés de su uso como herramienta de control ha crecido; fundamentalmente por el conocimiento adquirido sobre su biología, epidemiología, dispersión y por afectar a un amplio rango de hospedantes, no representan riesgo para la salud humana, medio ambiente o plantas³¹.

Además, por ser el suelo su hábitat natural, presentar ventajas adaptativas sobre otros controladores de insectos y finalmente los avances significativos en su producción a gran escala, formulación y métodos de aplicación, satisfacen criterios esenciales para el control biológico lo que los hace factibles de utilizarse en el control de ciertas plagas³².

²⁸ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 8.

²⁹ SAÑUDO, B. y CASTILLO, G. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas, 1994. 35 p.

³⁰ JIMÉNEZ, J. Utilización de agentes microbiales en el manejo integrado de plagas. En: Manejo Integrado de Plagas. Memorias Curso Internacional. San Juan de Pasto, Colombia. 1995. 56 p.

³¹ Ibid., p. 57.

³² POINAR, Op. cit., p. 31.

1.5.3.1 Aspectos taxonómicos. Existen ocho familias de nematodos reconocidas como parásitos de insectos, estas son: Allantonematidae, Mermithidae, Diplogasteridae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerularidae, Tetradonematidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae. Las dos últimas, están relacionadas con una bacteria simbiote que mata al hospedante rápidamente, razón por la cual han despertado mayor interés para el uso en programas de control microbiano de insectos³³.

La familia Steinernematidae, ha sido ampliamente estudiada como potencial biocontrolador de chisa, debido a su amplio rango de hospedantes, gran capacidad de búsqueda, alta virulencia, su facilidad para ser reproducido masivamente y sobretodo, porque no ocasionan problemas al ambiente³⁴.

El nematodo corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Animal
División:	Nemathelminthes
Clase:	Nematodo
Orden:	Rhabditida
Superfamilia:	Rhabditoidea
Familia:	Steinernematidae
Género:	Steinernema
Especie:	<i>Steinernema</i> ³⁵

1.5.3.2 Descripción del nematodo *Steinernema sp.*

Estos nematodos son gusanos cilíndricos no segmentados, el tamaño general varía de 0.3 a más de 10 milímetros, poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la hipodermis seguida por las fibras musculares longitudinales, son vermiformes, su cabeza es continua y poco diferenciada del cuerpo, presentan estoma superficial y triangular, el esófago es dividido en cuatro secciones, la anterior o PROCORPUS el cual es moderadamente ancho, de forma cilíndrica con un tubo central interno para introducir el alimento; el BULBO ESOFÁGICO MEDIO es poco pronunciado, de naturaleza muscular y un ensanchamiento ligeramente notorio con una válvula para regular el paso del alimento; el ISTMO,

³³ WOODRING, J. y KAYA, H. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. In: A handbook of techniques. Fayette Ville, Arkansas: Agricultural experiment station, 1988. 9 p. (Southern cooperatives series; no. 331).

³⁴ KLEIN, M.G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: R. GAUGLER R and KAYA, H. K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Florida: Boca Ratón, CRC Press, 1990. 196 p.

³⁵ WOUTS, W.M. *Steinernema (Neoaplectana)* and *Heterorhabditis* species. In: NICKEL, W.R. Manual de agriculture nematology. New York: Marcel Decker, 1991. 891 p.

estrechamiento alargado que conecta al BULBO ESOFÁGICO BASAL, el cual es ovoide, tiene valvas divididas descansando horizontalmente sobre el intestino, orificio de la glándula dorsal cerca al inicio del intestino. Las hembras son didélficas con dos ovarios opuestos y vulva cerca al centro del cuerpo, la cola es redondeada o ligeramente agudizada, sin bursa en los machos, tiene doble cutícula y la región bucal sin dientes dorsales³⁶.

1.5.3.3 Ciclo de vida del nematodo *Steinernema sp.*

Estos nematodos presentan un ciclo de vida simple pasa por el estado adulto con sus estructuras sexuales bien definidas; el estado de huevo desde su etapa monocelular hasta el total desarrollo embrionario; cuatro estados juveniles, denominados larvas, de los cuales el primer estado se desarrolla dentro del huevo. Se producen cuatro mudas o cambios de cutícula para que haya ocurrencia del segundo, tercero y cuarto estados larvales o juveniles, así como el estado adulto. La primera muda se da en el interior del huevo, formándose el segundo estado juvenil, el cual emerge después de haber debilitado la capa lipídica del huevo mediante la secreción de lipasas³⁷.

Una vez el segundo estado larval encuentra condiciones favorables en cuanto a la presencia del hospedante se suceden la segunda, tercera y cuarta muda, para dar paso al tercero y cuarto estado larval y al adulto respectivamente. Cuando hay condiciones desfavorables, el segundo estado juvenil llega a un estado de dormancia o latencia³⁸.

Para que se produzca una muda es necesaria la formación de una cutícula joven encima de la hipodermis ocurriendo un ablandamiento de la cutícula vieja, la cual se rompe por la cabeza. Por medio de las mudas, se promueve el crecimiento y desarrollo del nematodo, con la progresiva formación de las estructuras sexuales³⁹.

El tercer estado juvenil (J3 o IJ), es el único que permanece vivo fuera del hospedante, no se alimenta por que tiene reservas de energía en forma de carbohidratos y tiene la característica de buscar a su hospedante. Fisiológicamente se distinguen por tener un tracto alimenticio no funcional, lo que se puede apreciar a simple vista como una reducción en el lumen intestinal;

³⁶ SAÑUDO, B.; SALAZAR, C. y BETANCOURTH, C. Principios de nematología agrícola. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas, 2003. 15 p.

³⁷ Ibid., p. 11.

³⁸ Ibid., p. 11.

³⁹ Ibid., p. 11.

adicionalmente en la superficie de su cuerpo, mantienen la cutícula de su estado de desarrollo anterior (J2), lo que parece es la causa de su resistencia a diferentes factores bióticos y abióticos⁴⁰.

Una vez encontrado el insecto hospedante apropiado, los IJ se introducen en el a través de sus aberturas naturales (boca, ano o espiráculos), una vez en el interior del insecto, los IJ alcanzan el hemocele en un tiempo que puede ir desde los 30 segundos hasta los 60 minutos, libera su bacteria simbiote causando la muerte del insecto durante las primeras 48 horas después de la penetración. Los nematodos se alimentan, maduran hasta adultos y producen varias generaciones, hasta que la calidad nutricional del cadáver se deteriora, iniciándose en este momento, el desarrollo de infectivos juveniles (IJ), finalmente, estos emergen en busca de un nuevo hospedante⁴¹.

Los IJ de *Steinernema sp.* al parecer por cambios en la composición bioquímica del insecto causados durante la multiplicación del simbiote en el hemocele, pasan al siguiente estado (J4) el cual se alimenta del insecto y a partir de este se desarrollan dos estados adultos: hembra y macho. Una vez los adultos han madurado, se presenta la cópula y a partir de los huevos fecundados localizados en el interior de las hembras, se desarrollan los J1 con posterior desarrollo a J2 y J3; estos últimos (primera generación), salen de las hembras ejerciendo una presión mecánica desde su interior, lo que causa su rompimiento. Si la reserva de alimento que proporciona el hospedante es suficiente para continuar con un nuevo ciclo, se pueden presentar hasta tres generaciones anfimíticas dentro del mismo insecto. Por el contrario si la reserva alimenticia no es suficiente, el J3 adquiere la bacteria simbiote alimentándose de los tejidos del cadáver del insecto y lo abandona. En este momento del ciclo, el J3 que ya ha incorporado su simbiote y que esta listo ha abandonar el hospedante se conoce como IJ, el cual inicia la búsqueda de un nuevo hospedante para comenzar el ciclo⁴².

El ciclo de vida se completa en un periodo de 6 a 18 días con temperaturas de 18 a 28°C, dependiendo del insecto hospedante y de la especie de nematodo⁴³

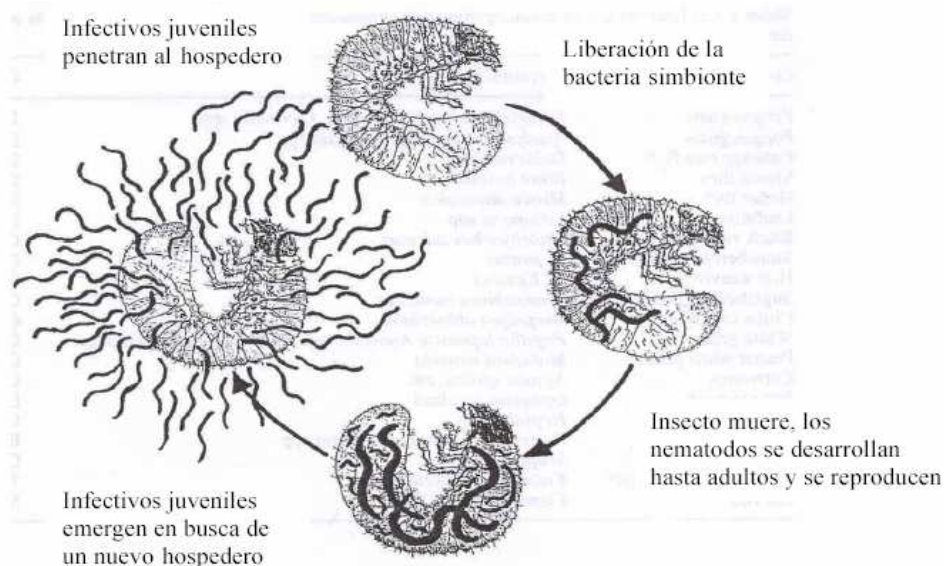
⁴⁰ POINAR, Op. cit., p. 27.

⁴¹ TANADA, Y. y KAYA, H. Nematodes, nematomorphs and plathelminthes. In: Insect pathology. San Diego, California: Academic Press, 1993. 343 p.

⁴² Ibid., p. 343.

⁴³ POINAR, Op. cit., p. 28.

Figura 1. Ciclo de vida general de los nematodos entomopatógenos.



Fuente: Ehler, 1990⁴⁴

1.5.3.4 Bacteria mutualista. La característica común que hace particular al nematodo *Steinernema sp.* es su asociación simbiótica con una bacteria entomopatógena que es transportada en una vesícula especial en el intestino. La bacteria asociada con Steinernematidos pertenece al género *Xenorhabdus* (*Achromobacter*); puede ser aislada en sus formas primarias y secundarias las cuales generalmente se distinguen por la morfología de sus colonias y la absorción de colorantes⁴⁵.

El género *Xenorhabdus* fue identificado inicialmente como *Pseudomonas septica* luego como *P. aeruginosa* y después como *Achromobacter nemetophillus*, es ahora conocida como una especie del género *Xenorhabdus*, familia Enterobacteriaceae⁴⁶.

⁴⁴ EHLER, L. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. 16 p.

⁴⁵ MONTUFAR BLANCO, E. Efectos de tres concentraciones del nematodo *Steinernema carpocapsae* y del cubrimiento del plato radicular con raquis en el control del barrenador de raíces (*Sagalassa valida w*) de palma africana de Tumaco. Pasto, Colombia, 1993, 78 p. Trabajo de Grado (Ingeniero agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

⁴⁶ WOUTS, Op cit., p. 878.

Esta simbiosis es de tipo mutualista, se caracteriza por la protección dada por el nematodo a la bacteria al ubicarse ésta dentro de su tracto digestivo, tanto de las condiciones ambientales externas, como de los mecanismos inmunológicos de defensa del insecto. Además, le sirve a la bacteria como medio de transporte desde cadáveres de insectos a insectos sanos y a nuevos hospedantes. La bacteria en contribución a esta asociación, provee de nutrientes esenciales al nematodo y evita invasiones secundarias de otros microorganismos, las cuales interfieren con su desarrollo y reproducción⁴⁷.

Estas bacterias se caracterizan por ser Gram – negativas, anaerobias, no esporuladas, tienen células en forma de bastón, con medidas de 3,0-10,5µ de longitud por 0,6-1,7µ de ancho, las cuales están estrechamente asociadas con nematodos entomopatógenos y son la causa de su patogenicidad sobre el insecto, no tienen estructuras de resistencia al medio ambiente por lo cual no han sido encontradas en la naturaleza excepto en el nematodo vector o insecto hospedante⁴⁸.

“La temperatura óptima para el desarrollo bacteriano es de 29°C, el pH es de 7 y la concentración óptima de NaCl es de 0,5%”⁴⁹.

La bacteria presenta dos fases (Fase I y Fase II). La primera es la fase ideal para el desarrollo del nematodo, probablemente porque proporciona un adecuado suplemento alimenticio y produce una serie de antibióticos los cuales limitan el establecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, por una razón desconocida, la Fase I puede pasar a la Fase II, la cual nunca proporciona los nutrientes ni la cantidad de antibióticos suficientes como los que produce la Fase I, lo que no permite el desarrollo de los IJ⁵⁰.

Una posible explicación de esta conversión está relacionada con la supervivencia de la bacteria, pero algunos estudios registran el aislamiento de bacteriófago de *Xenorhabdus luminescens*, el cual ataca células de la Fase I, pero no de la Fase II afectando la reproducción del nematodo. Sin embargo, esta probablemente no sea

⁴⁷ AKHURST, R. J. y DUNPHY, G. B. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N. and FREDERIC, B. A. Parasites and pathogens of Insects. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, 11 p.

⁴⁸ POINAR, Op. cit., p. 30.

⁴⁹ WOUTS, Op cit., p. 880.

⁵⁰ AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. In: Journal of General Microbiology. Vol. 121 (may. 1980); 305 p.

la única razón del cambio de fase y estén involucrados factores mucho más complejos⁵¹.

Estas fases de los simbioses, presentan ciertas características adicionales. A diferencia de la Fase II, la Fase I, se distingue por la producción de antibióticos y la absorción de colorantes dependiendo del aislamiento y la especie; además, colonias de esta Fase se pigmentan en cajas de cultivo, poseen bioluminiscencia y producen lecitinas, entre otros compuestos⁵².

En la Fase I las células son pleomórficas, estas son más largas que las células de la Fase II y tienen inclusiones paracrystalinas, protoplasmáticas y fimbrias, presentando una relación de bastones mayor (80-90%) que la de esferoplastos (10-20%)⁵³.

En la relación nematodo – insecto hospedante, llega a suceder que una especie de nematodo puede introducirse en varias especies de insectos relacionados o no taxonómicamente, o en grupos de determinados insectos. La acción patogénica de la bacteria relacionada con el nematodo que penetró en el hospedante, igualmente puede ser amplia o restringida observándose además de la variabilidad de la bacteria en cuanto a la severidad del proceso patogénico, el desarrollo de cepas avirulentas, hipovirulentas y virulentas⁵⁴.

El factor principal que determina la susceptibilidad del hospedante, es la habilidad de los nematodos para penetrar al insecto hospedante. Los hospedantes más susceptibles son generalmente los más fácilmente penetrados por los nematodos. La susceptibilidad de diferentes insectos a *Xenorhabdus* también depende de la habilidad de la respuesta de defensa del hospedante para limitar la reproducción bacteriana⁵⁵.

En algunos hospedantes susceptibles, la bacteria *Xenorhabdus sp.* no es reconocida o no es atacada y muerta por los hemocitos del hospedante, lo que le permite multiplicarse y matar al hospedante, aunque en otros, el porcentaje de

⁵¹ POINAR, Op. cit., p. 30.

⁵² AKHURST, Op. cit., p. 306.

⁵³ BOEMARE, N.; LAUMOND, C. y MAULEON, H. The entomopathogenic nematode bacterium complex; biology, life cycle and vertebrate safety. In: Biocontrol science and technology. Inglaterra. Vol. 6, No. 3 (jun. 1996); 336 p.

⁵⁴ SAÑUDO; SALAZAR y BETANCOURTH, Op. cit., p. 60.

⁵⁵ AKHURST, R. J. y DUNPHY, G. B, Op. cit., p. 12.

mortalidad de insectos es afectado directamente por las diferentes cepas de la bacteria simbiote⁵⁶.

Los valores de Dosis Letal (DL 50) varían de menos de 50 células bacterianas (hospedantes susceptibles) a más de 500 células (hospedantes menos susceptibles)⁵⁷.

La mayoría de los complejos nematodo/simbiote producen varias toxinas diferentes, que ayudan a asegurar su habilidad para infectar, matar y reproducirse en muchos hospedantes diferentes. Estas toxinas pueden neutralizar la respuesta inmunológica del hospedante. En casos tales con la combinación de *Steinernema glaseri* y *Xenorhabdus poinarii*, solamente juntos, el nematodo y la bacteria, infectan y matan a *Galleria melonella* no como patógeno aislado⁵⁸.

1.5.3.5 Síntomas de larvas de insectos afectadas por *Steinernema sp.*

Las larvas infectadas con Steinernematidos presentan inapetencia, disminución de movimiento, además son ligeramente decolorizadas y flácidas, permaneciendo intactas y presentando consistencia suave de los tejidos, las cuales no producen mal olor, por la no presencia de otros microorganismos diferentes a la bacteria *Xenorhabdus nematophyllus*, debido a que esta libera antibióticos y restringe el desarrollo de otra flora microbial, evitando la descomposición del insecto muerto⁵⁹.

La infección es seguida por una septicemia causada por la bacteria que es transportada al hospedante por el nematodo; la bacteria no infecta fácilmente a los insectos cuando es ingerida, pero si cuando es introducida por el nematodo, una vez las bacterias son descargadas en la hemolinfa, se multiplican y secretan toxinas, provocando la muerte del insecto cuya sangre se remplaza por una biomasa bacteriana que sirve de alimento a los nematodos, este proceso es rápido y dura de 3 a 4 días⁶⁰.

1.5.3.6 Experiencia de control de diferentes insectos con *Steinernema sp.*

El nematodo *Neoplectana carpocapsae* Weiser ataca las larvas de último ínstar y los estados de prepupa de *Oxidia trychiata* (medidor gigante) (Lepidoptera:

⁵⁶ GLAZER, I. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. In: Biocontrol science and technology. Vol. 6 (jun. 1996); 375 p.

⁵⁷ GEORGIS, R. y MANWEILER, S. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. In: Agricultural zoology reviews. Vol. 6 (oct. 1994); 70 p.

⁵⁸ AKHURST y DUNPHY, Op. cit., p. 12.

⁵⁹ WOODRING y KAYA, Op. cit., p. 15.

⁶⁰ BOEMARE; LAUMOND y MAULEON, Op. cit., p. 338.

Geometridae) bajo condiciones simuladas de campo. Se observó que algunas prepupas atacadas por el nematodo alcanzan a empupar pero mueren antes de emerger el adulto⁶¹.

El nematodo *Neoaplectana carpocapsae* ocasiona la muerte del 50 y 70% respectivamente de las pupas del gusano minador *Pseudaletia unipunctata* y el gusano medidor *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) en cajas Petri⁶².

El nematodo *Neoaplectana carpocapsae* Infecta más del 80% de las pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en suelos planos a concentraciones de 5 nematodos /cm²⁶³.

Se puede lograr entre el 60 y 70% de reducción de las poblaciones de gusano bellotero *Heliothis Zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) después de la aplicación del nematodo *Steinernema sp.*⁶⁴.

La especie *Steinernema carpocapsae* parasito exitosamente todos los estados del chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) en laboratorio. El adulto fue el estado más susceptible, con 58.6% después de 10 días de inoculado. Los menos susceptibles fueron el primer y segundo ínstar con 17 y 31% respectivamente⁶⁵.

Aplicaciones del nematodo *Steinernema sp* aplicados al follaje, lograron un control del 40 % en *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)⁶⁶.

El nematodo entomopatógeno *Steinernema sp.* ataca al picudo negro del banano *Cosmopotiles sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) en su estado larval y adulto en el campo, pero el costo y la eficacia de estos nematodos permiten utilizarlos solo

⁶¹ BUSTILLO, A. Patogenicidad del nematodo *Neoaplectana carpocapsae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxydia trychiata*. Contribución del programa nacional de entomología del ICA. Medellín, Colombia: ICA, 1976. 140 p.

⁶² KAYA, H. y HARA, A. Differential susceptibility of Lepidoptera pupae to infection by the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. In: Journal of invertebrate pathology. Estados Unidos. Vol. 36 (ene. 1980); 390p.

⁶³ KAYA, H. y GRIVE, B. The nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the beet armyworm; *Spodoptera exigua* in infective of prepupa and pupa in soil and the adults during emergence from soil. In: Journal of invertebrate pathology. Estados Unidos. Vol. 32, No. 2 (sep. 1982); 194 p.

⁶⁴ FERNÁNDEZ; ARTEAGA y PÉREZ, Op. cit., p. 7.

⁶⁵ CAICEDO, A.M. y BELLOTTI, A.C. Evaluación del potencial del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* W. (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Cyrtomenus bergi* F. (Hemiptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio. In: Revista colombiana de entomología. Vol. 20, No. 4 (ene. 1994); 244 p.

⁶⁶ GLAZER, I. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. In: Biocontrol science and technology. Vol. 6 (jun. 1996); 376 p.

en los lugares con altas densidades de poblaciones de los picudos negros, limitando su uso a gran escala por el momento”⁶⁷.

Se han realizado otros estudios cuyos resultados preliminares demuestran que la polilla *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Golenchidae) es altamente susceptible a la infección por nematodos. 53 IJ de *Steinernema sp.* por larva, fueron suficientes para producir una mortalidad del 100% utilizando envases de arena, mientras que para producir 90% de mortalidad de larvas de polilla, en ensayos de papel filtro fue necesario utilizar concentraciones de 280 IJ de *Heterorhabditis sp.* por mililitro”⁶⁸.

Se han realizado estudios para el control biológico de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) utilizando el nematodo *Steinernema sp.*, el cual ha reducido la población de estos insectos en proporciones satisfactorias. Estudios realizados por los mismos autores en el Centro Nacional de Investigación de Café (Cenicafé), demostraron que una aplicación de juveniles infectivos (IJ) de *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora* en el suelo infectan a la broca dentro del fruto sobre y cubierto por el suelo, reduciendo significativamente sus poblaciones⁶⁹.

Otros ensayos realizados en Cenicafé, se observó parasitismo en pupas y en adultos no melanizados de broca, lo que señala la posibilidad de control de poblaciones de broca en frutos en el suelo cubiertos por hojarasca, además se comprobó que la broca del café remanente dentro de frutos cubiertos por un obstáculo, son afectados por el efecto patogénico de los nematodos entomopatógenos⁷⁰.

Así mismo se han realizado estudios en los cuales se logró verificar, en condiciones de laboratorio, que las tres especies de nematodos entomopatógenos evaluadas *Steinernema feltiae*, *Steinernema sp.* y *Heterorhabditis bacteriophora* infectan larvas del barrenador de raíces de la palma de aceite *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterigidae); no obstante, se obtuvieron mejores porcentajes de mortalidad con la cepa nativa *Steinernema sp.* que con las dos

⁶⁷ GOLD, C.S. y MESSIAEN, S. El picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus*. Bogotá: Inibap. Plagas de musa, 2000. 3 p. (Hoja divulgativa; no. 4).

⁶⁸ FAN, X.; MAGGIORANI, A. y GUIDIÑO, S. Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). En: Revista forestal. Vol. 44, No. 1 (sep. 2000); 116 p.

⁶⁹ MOLINA, J. y LÓPEZ, J. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. En: Boletín de sanidad vegetal. Vol. 29 (dic. 2003); 598 p.

⁷⁰ MOLINA, J. y LÓPEZ, J. Desplazamiento y parasitismo de entomonematodos hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). En: Revista Colombiana de Entomología. Vol. 28, No. 2 (may. 2002); 149 p.

cepas importadas de Alemania. Además, *Steinernema sp.* se multiplicó en las larvas de la plaga, contrario a las otras dos especies para las cuales *Sagalassa valida* mostró un nivel de respuesta inmune a los juveniles infectivos, que impidió que se completara su ciclo de vida⁷¹.

Otras plagas agrícolas susceptibles a nematodos son *Plutela xilostella*, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pilyidae), *Diablotica sp.* (Coleoptera: Chrisomelidae), *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), *Agrotis ípsilon* (Lepidoptera: Noctuide), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pilyidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), entre otras⁷².

1.5.3.7 Ecología y dispersión. El hábitat natural de los nematodos entomopatógenos es el suelo, el cual varía generalmente en composición química y estructura física. Estos nematodos parásitos de insectos tienen preferencias por suelos que permitan una buena y abundante distribución de oxígeno como es el caso de los suelos de textura porosa y/o arenosa, en donde características propias del nematodo como actividad parasítica, sobrevivencia y dispersión, no se afectan⁷³.

Cambios ocasionados por factores externos que alteren condiciones de habitad natural como tamaño de poros del suelo, disponibilidad de agua, humedad, temperatura y composición química entre otros, tanto individual como en su interacción pueden alterar desde su persistencia en el campo hasta su dispersión⁷⁴.

La dispersión del nematodo está íntimamente relacionada con la búsqueda del hospedante y puede ser de dos tipos: **Dispersión activa**, depende del nematodo e involucra características fisiológicas como: necesidad de búsqueda de hospedantes y la quimiotaxis, guardando una estrecha relación los dos últimos⁷⁵.

⁷¹ SÁENZ, A.; BENÍTEZ, A. y DE HARO, E. Patogenicidad y signos en larvas del barrenador de raíces de palma de aceite, *Sagalassa valida*, por nematodos entomopatógenos. En: Ceniavances. Tumaco, Nariño: Corporación Centro de Investigaciones de Palma de Aceite CENIPALMA. 2005. 77 p.

⁷² FERNÁNDEZ; ARTEAGA y PÉREZ, Op. cit., p. 8.

⁷³ KAYA, H. Soil ecology. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. 96 p.

⁷⁴ Ibid., p. 96.

⁷⁵ DUCEMBERG, D.B. Chemotactic behavior of nematodes. In: Journal of nematology. Estados Unidos. Vol. 15, No. 2 (mar. 1983); 170 p.

Dentro de las sustancias reconocidas como estimuladoras de la quimiotaxis, se registran solventes orgánicos, compuestos acuosos y nitrogenados recuperados de la cutícula y desechos fecales de insectos, metabolitos de nematodos fitopatógenos y agregaciones bacterianas, feromonas sexuales, exudados de raíces de las plantas, entre otros⁷⁶.

Dentro de los estimuladores de la quimiotaxis el que principalmente activa la búsqueda de hospedantes, es la respiración del insecto blanco potencial, pues se generan gradientes de CO₂ que son detectados por el nematodo, aunque algunos factores adicionales intervienen ya sea incrementándola o retrasándola. En este mismo sentido, se ha podido determinar que esta respuesta difiere con la especie, siendo condicionada tanto por factores bióticos como abióticos⁷⁷.

En la **Dispersión pasiva**, intervienen factores externos al nematodo como: viento, agua, actividades humanas, entre otros⁷⁸.

Esta búsqueda de hospedantes que es consecuencia de una necesidad fisiológica de desarrollarse y multiplicarse de los IJ y que es un proceso activo, lleva a una selección del hábitat a través del perfil del suelo. Lo anterior, ha permitido diferenciarlos en aquellos nematodos que prefieren buscar a su blanco cerca o en la superficie del suelo, caracterizándose por su desplazamiento horizontal (ej. *Steinernema carpocapsae*), mientras que otros tienden a profundizarse en el perfil del suelo (desplazamiento vertical, ej. *Heterorhabditis bacteriophora*); ya en cada uno de sus hábitats, adoptan dos estrategias: de emboscada o crucero. Los que utilizan la estrategia de emboscada como *Steinernema carpocapsae*, guardan su energía esperando hasta la aproximación del hospedante en la superficie, siendo de esta manera los emboscadores pobremente adaptados para atacar hospedantes que se profundizan e inmovilizan en el suelo. Los que asumen la segunda estrategia conocidos como cruceros, son bastante móviles y responden notoriamente a los quimioatrayentes del hospedante. De acuerdo con algunos autores estas especies “cruceiras” pueden ser las mejores adaptadas para parasitar hospedantes sedentarios subterráneos⁷⁹.

⁷⁶ ZUCKERMAN, B.M. y JANSSON, H.B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host – prey recognition. *In*: Annual review of phytopathology. Estados Unidos. Vol. 15, No. 2 (ago. 1984); 171 p.

⁷⁷ GAUGLER, R.; CAMPBELL, J.F. y GUPTA, P. Characterization and basis of enhanced host – finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. *In*: Journal of invertebrate pathology. Vol. 57 (may. 1991); 239 p.

⁷⁸ SMITS, P. H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides. *In*: Microbial insecticides: novelty or necessity. Farham, Inglaterra: British Crop Protection Council, 1997. 289 p. (Symposium proceedings; no. 68).

⁷⁹ AKHURST y DUNPHY, Op. cit., p. 17.

Los factores que afectan la dispersión activa del nematodo en el suelo para encontrar al hospedante, incluyen:

- Los espacios intersticiales, que en los suelos arcillosos son pequeños y limitan el movimiento del nematodo.
- La humedad, los nematodos requieren de una película de agua para dispersarse en el suelo; pero, en condiciones secas y cuando oscila la temperatura de 5 a 25 °C se incrementa la dispersión de 0 a 50%. Las condiciones secas con bajas temperaturas inhiben el movimiento por falta del agua para moverse y la temperatura induce a la inactividad. Los niveles altos de humedad o el exceso de agua reducen la dispersión del nematodo, debido a la anoxia y al deslizamiento.
- La presencia de un hospedante; la mayoría de los nematodos entomopatógenos no se dispersan activamente en presencia del hospedante, aunque la presencia de un hospedante incrementa significativamente el número de IJ en dispersión (4 a 90 cm); a la mayoría de ellos se les encuentra cercanos al sitio donde se colocan.
- Las plantas afectan directa e indirectamente a los nematodos de muchas formas, pues crean un gradiente de humedad en la rizósfera e influyen en la temperatura del suelo al interceptar la radiación solar. Las raíces de las plantas al respirar reducen el O₂ e incrementan el dióxido de carbono en el suelo circundante y crean gradientes de O₂ y dióxido de carbono cercano a las raíces. Estas raíces pueden afectar la dispersión del nematodo; *Steinernema glaseri* se acumula alrededor de las raíces en respuesta al CO₂ y esta conducta puede llevar al nematodo a un contacto más cercano con un hospedante sedentario que se alimente en la zona de raíces⁸⁰.

La aplicación de nematodos entomopatógenos con un comportamiento navegador (controladores de insectos sedentarios y/o subterráneos), que se dispersen en una extensión más amplia del suelo y en cuestión de temperatura, nematodos que estén adaptados a condiciones un poco más frías a las temperaturas de la interfase suelo-humus, vendría notablemente a mejorar la amplitud de búsqueda del hospedante, tener mayores probabilidades de establecer el contacto nematodo – hospedante, beneficiar la eficacia, bajar los costos de aplicación y el número de nematodos⁸¹.

⁸⁰ KAYA, Op. cit., p. 100.

⁸¹ CAMPBELL, J. Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae y Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turf grass. *In*: Biological Control. Vol. 5 (abr. 1995); 595 p.

En términos generales los factores que alteran la actividad de estos nematodos parásitos de insectos, puede considerarse en dos: abióticos y bióticos⁸².

Factores abióticos. Los factores abióticos pueden afectar de una u otra manera significativa la efectividad de los nematodos entomopatógenos en el control de insectos plaga; al limitar la búsqueda y entrada al hospedante⁸³.

Temperatura. La temperatura puede ser el factor abiótico de mayor efecto sobre los nematodos, ya que afecta la supervivencia patogenicidad e infectividad⁸⁴.

El efecto de la temperatura en la supervivencia de los nematodos varía con las distintas razas y especies. Temperaturas extremas por debajo de 0 °C y arriba de 40 °C son letales a numerosos nematodos, dependiendo de el tiempo de exposición y de la especie⁸⁵.

S. riobrase, *S. carpocapsae* y *S. glaseri* sobreviven a una exposición a – 4 °C con valores de dosis letal (DL 50) de 2.1, 2.8 y 0.6 días respectivamente. La incubación de *S. carpocapsae* en glicerol al 20% durante 48 horas previas al congelamiento a – 20 °C mejora la supervivencia de 15 a por lo menos 30 días, así mismo se mantiene la patogenicidad de los nematodos después de 24 días a – 20 °C⁸⁶.

Las especies de nematodos que son nativas de regiones templadas, (*S. feltiae* y *H. megidis*) tienden a ser más tolerantes a las temperaturas frías del suelo en comparación con las especies aisladas en regiones cálidas (*S. reobrase*)⁸⁷.

Especies tropicales, como *H. indica*, sobreviven pobremente a temperaturas debajo de 15 °C, sin embargo, las especies adaptadas al calor pueden tolerar temperaturas altas como 40 °C como es el caso de *H. indica*, o *S. riobrase* que

⁸² GLAZER, Op. cit., p. 375.

⁸³ SMITS, P. H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides. In: Microbial insecticides: novelty or necessity. Farham, Inglaterra: British Crop Protection Council, 1997. 258 p. (Symposium proceedings; no. 68).

⁸⁴ KUNG, S. P.; GAUGLER, R. and KAYA, H. k. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 55, No. 3 (may. 1990); 401 p.

⁸⁵ GLAZER, Op. cit., p. 376.

⁸⁶ BROW, I. M. y GAUGLER, R. Temperature y humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. In: Nematologica. Vol. 43 (jun. 1997); 370 p.

⁸⁷ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990, Op. cit., p. 401.

puede tolerar exposiciones cortas a 42 °C aunque las altas temperaturas incrementan la tasa de metabolismo y acortan el lapso de vida”⁸⁸.

La temperatura óptima para la penetración y establecimiento del nematodo depende de los efectos de la temperatura en el nematodo y el insecto hospedero. Si bien muchas especies de nematodos infectan insectos en un amplio rango de temperatura, la infectividad se ve reducida arriba de 30 °C y debajo de 15 °C en general la mortalidad de los insectos se reduce a temperaturas frías por la disminución de la habilidad del nematodo para moverse a bajas temperatura⁸⁹.

Humedad. Klein afirma que: “La humedad es fundamental para mantener el estado de hidratación, movimiento e infección del nematodo y a menudo el factor más crítico para su supervivencia”⁹⁰.

De acuerdo a Kaya: “Los Steinernematidos pueden sobrevivir a relativa baja humedad del suelo, similar a la presente en suelos naturales, sin embargo su capacidad de búsqueda del hospedero e infectividad puede reducirse”⁹¹.

Dentro de los Steinernematidos Kondo y Ishibashi encontraron que: “*S. carpocapsae* a 25 y 40 % de humedad relativa fue efectivo en *Spodoptera litura*, así como también que a 10, 15 y 50 % de humedad relativa, los juveniles infectivos no fueron capaces de infectar a los insectos; no obstante la alta persistencia de los juveniles infectivos a 25 y 40 % de humedad relativa; así mismo observaron que el comportamiento de nictación no fue afectado por las condiciones de humedad”⁹².

En un suelo de arena y a 7 % de humedad con 15 °C el 100 % de *S. glaseri* sobrevive por 24 semanas y alrededor del 90 % sobrevive por 32 semanas, con el 79.5 % de humedad relativa, *S. carpocapsae* sobrevive hasta un 90 % durante 12 días en cámaras de suelo. Cuando *S. carpocapsae* y *S. glaseri* fueron colocadas

⁸⁸ KAYA, Op. cit., p. 101.

⁸⁹ KUNG, S. P.; GAUGLER, R. and KAYA, H. k. Effects of temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 57, No. 2 (mar. 1991); 246 p.

⁹⁰ KLEIN, M.G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: R. GAUGLER R and KAYA, H. K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Florida: Boca Ratón, CRC Press, 1990. 201 p.

⁹¹ KAYA,, Op. cit., p. 101.

⁹² KONDO, E. y ISHIBASHI, N. Effects of soil moisture on the survival and infectivity of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (DD - 136). In: Proceedings of the Association for Plant Protection Kvushu. Vol. 31 (feb. 1985); 188 p.

en un suelo magañoso a diferentes humedades del suelo, ambas especies sobrevivieron bien con el 2 y el 4 % respectivamente⁹³.

Al evaluar a 75, 85, 96 y 100 de humedad relativa nematodos entomopatógenos en *Galleria mellonella* encontraron que *H. bacteriophora* y *S. feltiae* emergen a baja humedad relativa; concluyendo que los juveniles infectivos pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas por periodos limitados en el cadáver del hospedante⁹⁴.

Los juveniles infectivos de *H. bacteriophora* son capaces de sobrevivir a una humedad relativa mayor al 93% por extensos periodos (arriba de 18 días) aunque bajo estas condiciones los juveniles infectivos no fueron móviles, su tamaño fue menor y poseían el 25% del agua, los autores concluyen que pueden tener adaptación con un mínimo nivel de humedad si este se sostiene durante todo el año, sugiriendo que *H. bacteriophora* es capaz de limitar la anhidrobiosis que puede ser inducida por una baja deshidratación y que también bajo distinto régimen de humedad existe una considerable variación en tolerancia a la desecación entre aislados de Heterorhabditidos⁹⁵.

Textura. La textura del suelo afecta la movilidad, persistencia e infectividad del nematodo, siendo las texturas arenosas y francas las más favorables.

Al evaluar la textura areno limosa, limo arcillosa y arcillosa durante 16 semanas en *S. carpocapsae* y *S. glaseri*, la más baja supervivencia fue observada en suelos arcillosos para ambas especies. En suelos arcillosos y limo arcillosos, la tasa de mortalidad fue de 40 a 50 % en las primera dos semanas, estabilizándose a una tasa de 1 a 2 % por semana para *S. carpocapsae* y 5 % por semana para *S. glaseri* con un bajo incremento para *S. glaseri* entre la cuarta y la octava semana⁹⁶.

En los suelos arcillosos, el pequeño diámetro de los poros y la reducción de la aireación constituyen los aspectos de mayor influencia en la supervivencia del nematodo y en la reducción su infectividad⁹⁷.

⁹³ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1991, Op. cit., p. 247.

⁹⁴ BROW, I. M. y GAUGLER, Op. cit., p. 370.

⁹⁵ LIU, Q. Z. y GLAZER, I. Dissiccation survival of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. In: Phytoparasitica. Vol. 28, No. 4 (oct. 2000); 335 p.

⁹⁶ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990, Op. cit., p. 402.

⁹⁷ KAYA, Op. cit., p. 101.

pH del suelo. Al evaluar el efecto del pH del suelo encontraron que la supervivencia y patogenicidad se disminuye ligeramente a medida que se reduce el pH de 8 a 4, esto no sucede cuando existe un pH de 10 ya que entonces se declina la supervivencia de una manera drástica y no hay muestras de habilidad para matar larvas de *G. mellonella*. La acidez del suelo también tiene un efecto importante en el nematodo⁹⁸.

Oxígeno. Los niveles de oxígeno dentro de los nematodos son principalmente determinados por los niveles de oxígeno del ambiente y el tamaño del cuerpo, debido a que los nematodos no poseen sistema respiratorio y circulatorio, la tolerancia de los nematodos a la falta de oxígeno varía drásticamente entre especies⁹⁹.

La supervivencia de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* decrece significativamente después de 8 semanas cuando las condiciones de oxígeno experimentadas se reducen de un 20 a un 1 %, no registrándose supervivencia después de 16 semanas así mismo no se registro patogenicidad de ambas especies a concentraciones de oxígeno de 1, 5 y 10 % después de 2 semanas y a 20 % después de 16 semanas¹⁰⁰.

El oxígeno puede llegar a ser un factor limitante para los nematodos en suelos con alto contenido de arcilla, materia orgánica o saturados de agua. Sin embargo los estudios de Bedding demostraron que los juveniles infectivos de *S. carpocapsae* bajo condiciones de deficiencia de oxígeno, la supervivencia del nematodo es similar con condiciones aeróbicas y esta depende principalmente de las reservas de energía del nematodo¹⁰¹.

Dentro de estos factores, la temperatura unida a la humedad del suelo, afectan principalmente la persistencia y dispersión. Estos nematodos parásitos de insectos presentan variabilidad inter e intra específica, en relación con la tolerancia a la temperatura, presentándose sobrevivencia y eficacia en parasitismo, dentro de un amplio rango (3-35°C). Valores de pH extremos (11 o 3), limitan su capacidad de infección más no su viabilidad. Humedades extremas, además de afectar su viabilidad y establecimiento, pueden dificultar su movilidad. Suelos con baja humedad causan el desecamiento del nematodo, mientras que suelos muy

⁹⁸ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990, Op. cit., p. 403.

⁹⁹ BEDDING, R. A. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic in nematode technology into developing countries. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. v. 12, 239 p.

¹⁰⁰ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990, Op. cit., p. 404.

¹⁰¹ KAYA,, Op. cit., p. 102

saturados donde se generan condiciones anaeróbicas, reducen su viabilidad. Suelos salinos o con altas concentraciones de iones (altos niveles de aluminio), afectan su integridad celular, por lo tanto su viabilidad¹⁰².

El factor temperatura y sus extremos son causa del éxito o fracaso del programa de control. Cuando la humedad del suelo es la adecuada, pero las temperaturas son bajas (12 a 14 °C) o altas, se afecta a los nematodos, a la bacteria simbiote, o ambos¹⁰³.

Factores bióticos. Teniendo en cuenta que la asociación nematodo e insecto es una relación tripartita (nematodo – bacteria simbiote – hospedante), los agentes bióticos pueden intervenir en el desarrollo, multiplicación y establecimiento en diferentes niveles resumiéndolos en términos generales en tres: 1) afectando la sobrevivencia de los juveniles o larvas, 2) afectando el establecimiento y/o desarrollo de la bacteria simbiote, 3) afectando al insecto parasitado¹⁰⁴.

1.5.3.8 Localización, penetración y proceso de infección. El proceso de localización del hospedante por parte de los nematodos se cumple en tres fases principales:

Localización del hospedante por la atracción del dióxido de carbono (CO₂), el cual es considerado como un atrayente universal de los nematodos en general. La segunda fase es el contacto con el hospedante, fase en la cual se requiere de CO₂ y de desechos más específicos producidos por los insectos como las Kairomonas. El CO₂ juega un papel importante en la penetración del hospedante por el ano y los espiráculos, al orientar a los nematodos hacia estas vías de penetración, cumpliéndose la última fase del comportamiento de búsqueda.

Los estados juveniles infectivos (IJ) localizan al hospedante y entran a través de las aperturas naturales boca, ano y espiráculos, penetran en la pared del intestino hasta alcanzar el hemocele, liberando la bacteria, la cual se multiplica rápidamente matando al hospedante en 48 horas por septicemia¹⁰⁵.

¹⁰² ISHIBASHI, N. y KONDO, E. Behavior of infective juveniles. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca ratón, CRC Press, 1990. 142 p.

¹⁰³ EHLER, Op. cit., p. 19.

¹⁰⁴ EPSKY, N.D.; WALTER, D.E. y CAPINERA, J.I. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). In: Journal of economic entomology. Vol. 81 (nov. 1998); 705 p.

¹⁰⁵ WOODRING y KAYA, Op. cit., p. 12.

Los estados infectivos se alimentan de los nutrientes que las bacterias degradan del tejido del hospedante, crecen, se aparean y producen de 2 a 3 generaciones, de las cuales emergen nuevos estados infectivos. La primera generación de adultos son grandes, especialmente la hembra, la cual produce los huevos en masa y los cría dentro del hospedante. La segunda generación de adultos es más pequeña que la primera y no completa su desarrollo hasta el estado adulto final¹⁰⁶.

Los nematodos requieren entre 24 y 48 horas para localizar al hospedante, por tanto las aplicaciones de nematodos pueden hacerse 72 horas después de la aplicación de plaguicidas incompatibles o después de que el plaguicida sea absorbido a niveles no tóxicos a los nematodos. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones para determinar la concentración específica y el tiempo que pueden ser aplicados sin afectar a los nematodos y así determinar un comportamiento general para cada grupo de plaguicidas¹⁰⁷.

1.5.3.9 Cultivo de nematodos

In vivo (utilizando larvas hospedantes). La infección de insectos vivos para la producción masiva de patógenos ha sido muy utilizada en el pasado y aún se usa ampliamente incluso en la industria.

De acuerdo con Martignoni existen comúnmente tres maneras de usar los insectos como sustratos para la producción masiva de patógenos:

- Especímenes sanos que se colectan en el campo y se infectan en los laboratorios, ha sido de gran ayuda para la producción masiva de entomopatógenos y es preferida cuando las especies de insectos involucrados son difíciles de criar a gran escala en el laboratorio o tienen un ciclo de vida muy largo.
- Los insectos son criados e infectados en el laboratorio o en la planta de producción, es más confiable y más adecuada para la producción a gran escala, siempre y cuando las especies de insectos puedan adaptarse a los procedimientos de cría en el laboratorio y tengan un ciclo de vida corto.

¹⁰⁶ POINAR, Op. cit., p. 32.

¹⁰⁷ WOODRING y KAYA, Op. cit., p. 15.

- Especímenes enfermos o muertos son colectados en las poblaciones de campo que estén expuestas a epizootias inducidas natural o artificialmente, ha sido usada en forma intensiva en el control microbial¹⁰⁸.

Establecen que dado que los Steinernematidos infectan y se reproducen en un amplio espectro de insectos pueden ser fácilmente criados in vivo en el laboratorio. La plaga de los apiarios *Galleria melonella* es a menudo usada como hospedante, ya que está ampliamente disponible, es fácilmente criada, es muy susceptible y un excelente hospedante para la reproducción de nematodos¹⁰⁹.

Para la cría de la polilla de la cera *Galleria melonella* se debe tener en cuenta el alimento natural de este insecto (polen, miel y cera de abejas). Sin embargo, para la cría de este insecto, la alimentación de las larvas está basada en una dieta artificial compuesta por: miel de abeja, glicerina, agua, cereal para bebé, levadura de cerveza y cera de abeja. Para la cría del insecto se debe utilizar contenedores de vidrio o metal, tales como jarras de boca ancha o canecas, ya que las larvas mastican la madera y el plástico suave, por lo tanto se recomiendan tapas con mallas metálicas. Se colocan 1000 huevos por un galón de la jarra, y se llevan a una temperatura de 30 °C¹¹⁰.

In vitro (Medios de cultivo artificial). Existen cuatro medios que han sido usados en una época o en otra para el cultivo de nematodos, entre ellos se encuentran:

a. Levadura – Agar. En cajas de Petri en una infusión de agar, dextrosa y carne de ternera son inoculadas con un cultivo de levadura Fielshemann, purificada de bacterias. Después de 24 a 28 horas, las levaduras forman un crecimiento exuberante; la caja, entonces es inoculada con el nematodo e incubado a una temperatura de 21 a 24°C. Después de 6 a 7 días, se forman larvas de segundo estadio.

b. Agar – levadura – Ovario. Ovarios disecados de vaca, diseminados sobre la superficie humedecida durante la época de inoculación del nematodo (cerca de 1 mg/cm² de superficie del cultivo), han hecho posible mantener el nematodo in

¹⁰⁸ MARTIGNONI, M. Producción masiva de insectos. En: Control biológico de las plagas de los insectos y malas hierbas. México: CECSA, 1978. 685 p.

¹⁰⁹ WOODRING y KAYA, Op. cit., p. 15.

¹¹⁰ Ibid., p. 18.

vitro, en cultivos de levadura para una mayor cantidad de transferencia que los que se podían obtener con el método simple de agar – levadura.

c. Papa – levadura. El medio de papas consiste en una mezcla de papas y otros tubérculos. Esta mezcla es inoculada con levadura de panadería antes de colocar a los nematodos en los cultivos, se agrega un preservativo para evitar el crecimiento de hongos. Los cultivos son incubados por un período de 6 a 10 días, a una temperatura de 21 °C. Antes de la inoculación con los nematodos y durante la incubación, el pH del medio debe ajustarse dentro de los límites de 7 a 7.6.

d. Pulpa de ternera. Carne de ternera fresca libre de grasa, es molida 3 veces en un molino, pesada y mezclada en una proporción de 2 veces su peso en agua y colocada en una caja con hielo por 18 a 48 horas. Luego se coloca en un embudo de tela, se exprime cuantas veces como sea necesario, ya sea manualmente o a presión. Luego, la masa es colocada en recipientes de cultivo. Este método produce de 10.000 a 12.000 nematodos por centímetro cuadrado¹¹¹.

Multiplicación artesanal. Este tipo de procedimiento consiste en lograr una inoculación uniforme del suelo con los nematodos y allí exponer los insectos hospedantes a la infección. Periódicamente se aumenta suelo y los recipientes que lo contienen también deben ser más grandes, logrando al final una cantidad significativa de suelo infestado. Los pasos son los siguientes:

a. Infestación inicial. Cuando se ha hecho la primera infestación y hay una buena cantidad de insectos muertos. Estos se colocan en una pequeña caja de madera que contiene una capa delgada de suelo, el cual se debe mantener con una humedad aproximada a la capacidad de campo. También se disponen larvas vivas y sanas del hospedante, y cuando haya dificultades en conseguirlas en el campo, se colocan larvas de *Galleria melonella*. Encima de ellas se agrega una capa delgada de suelo húmedo. Las cajas se tapan no herméticamente.

b. Incremento de inóculo. Cuando se observa muerte de las larvas que se colocan, se aumenta la cantidad de suelo, se revuelve con el anterior y se disponen más larvas sanas, las cuales se cubren con una delgada capa de suelo. Las cajas se tapan no herméticamente y se hacen observaciones periódicas.

¹¹¹ MARTIGNONI, Op. cit., p. 686.

El procedimiento implica la necesidad de mantener poblaciones del insecto hospedante y de ir periódicamente aumentando el número de recipientes, obteniendo en tiempos relativamente cortos altos volúmenes de suelo contaminado con nematodos, el cual se emplea para dispersarlo en el campo¹¹².

1.5.3.10 Extracción de nematodos

Método modificado del Embudo de Baermann. El implemento consiste en un embudo de tamaño mediano de vidrio o plástico con una manguera de goma incrustada a la parte inferior y con una pinza en su extremo inferior para impedir la salida del líquido. Es conveniente trabajar con suelo que tenga una humedad cercana a la capacidad de campo, tomando una cantidad de 100 a 200 centímetros cúbicos que se deposita en un balde con 3 litros de agua, se agita fuertemente la suspensión, para dejar decantar por 5 segundos y verter poco a poco el sobrenadante a través de 3 tamices superpuestos de arriba hacia abajo, con los números 60, 230 y 325.

Antes de verter el agua es conveniente humedecer las mallas, para que el líquido pase con mayor facilidad; sin embargo, a medida que se va vertiendo el agua, los tamices se mueven suavemente si se detecta que el tamiz inferior se está llenando, se deja de verter y se repite los movimientos hasta que se desaloje el líquido. Luego se agita de nuevo la suspensión del balde para dejar decantar y volver a verter a través de los tamices. Esta operación se repite hasta agotar toda el agua quedando el suelo en el fondo del balde.

El sedimento de suelo que quede en los tamices número 230 y 325, se va uniendo en un solo sitio por medio de un chorro suave, con una manguera de goma conectada a un grifo o con un frasco lavador y con una espátula se lo deposita en un papel toalla doble, envolviendo bien. La muestra se coloca encima de un disco de malla fina de polipropileno colocado en la parte superior de un embudo de Baermann lleno con agua, la cual debe cubrir parcialmente el papel toalla que contiene el suelo.

Al cabo de 48 horas, en vidrios de reloj o tapas de cajas Petri pequeñas se toman pequeñas porciones de agua abriendo la pinza que sujeta la manguera de goma conectada al embudo para hacer la observación al estereoscopio¹¹³.

¹¹² SAÑUDO; SALAZAR y BETANCOURTH, Op. cit., p. 96.

¹¹³ AGRIOS, G. Manual de enfermedades de las plantas. México: Limusa, 1991. v. 4, 631 p.

Método de gravedad de Cobb. Se emplea el mismo juego de tamices por separado, para lo cual un kilogramo de suelo se lleva a un balde con 6 a 8 litros de agua, revolviendo vigorosamente y vertiendo el líquido a través del tamiz número 60, para recogerlo en un balde y el contenido de éste, se vierte por el tamiz número 325 desechando el líquido¹¹⁴.

El sedimento de los tamices número 230 y 325 se lo recoge y acumula en un papel toalla doble, que se envuelve para depositarlo en un embudo de Baermann casi lleno con agua y sobre un disco de malla fina de polipropileno. A las 48 horas se hace el examen de los nematodos depositados en el sitio donde la pinza sujeta la manguera¹¹⁵.

Método de centrifugación – flotación. Se procede a tamizar la suspensión de suelo por los tres tamices superpuestos como en el primer método. Los sedimentos de suelo colectados de los tamices números 230 y 325 se suspenden en un poco de agua limpia para someterlos a centrifugación a 4.000 rpm durante 4 minutos.

El sobrenadante se elimina y el sedimento que contiene los nematodos, se cubre con una solución de azúcar al 50% en agua. Los tubos se tapan y se agita el contenido hasta que se suspenda el sedimento; luego se llenan con la solución de azúcar y se someten a centrifugación a 3.000 rpm, durante 30 a 120 segundos. Los nematodos quedan suspendidos en el sobrenadante.

El sobrenadante se decanta en un tamiz número 325, a través de un sitio de la malla pegado a la pared del recipiente. Posteriormente, se lava suavemente la solución azucarada y los nematodos limpios se vierten a un vidrio de reloj o a una tapa de caja Petri pequeña con la ayuda de un frasco lavador. Luego se cumplen los procedimientos de identificación y conteo¹¹⁶.

Trampa de White. Esta técnica se emplea para extraer mayores poblaciones de nematodos y consiste en un recipiente circular de vidrio, que puede ser de diferente diámetro y de unos 3 cm de altura, en donde se coloca en el centro y en posición invertida, una tapa de caja Petri de 5 cm de diámetro y 1 cm de altura o un vidrio de reloj. Encima se dispone papel filtro o papel facial y se colocan los cadáveres frescos de insectos muertos por nematodos. Posteriormente, se llena

¹¹⁴ Ibid., p. 633.

¹¹⁵ SAÑUDO; SALAZAR y BETANCOURTH, Op. cit., p. 100.

¹¹⁶ AGRIOS, Op. cit., p. 633.

con agua destilada hasta que cubra los bordes del papel filtro, sin que llegue al piso superior de la tapa de Petri o vidrio de reloj, donde se han colocado los insectos.

Todo el conjunto se tapa no herméticamente y se lleva a un ambiente oscuro con una humedad aproximada de 20°C. Los nematodos abandonan los cadáveres, se deslizan sobre el papel filtro húmedo y caen al agua. Las poblaciones separadas se emplean para nuevas infestaciones o para conservación del inóculo¹¹⁷.

1.6 SUSTRATOS ORGÁNICOS

Es un producto que al ser aplicado al suelo activa principalmente los procesos microbiales, fomentando simultáneamente su estructura, dirección y capacidad de humedad y aportando pequeñas cantidades de nutrientes. Incluye subproductos animales, estiércol, residuos vegetales y lombricompuesto¹¹⁸.

1.6.1 Lombricompuesto. La lombricultura es una actividad que recicla desechos orgánicos produciendo abono y proteína animal, utilizando para esto lombrices de tierra, especialmente adaptadas para vivir en condiciones de alta densidad y que exceptuando vidrio, lata y plástico consumen todo tipo de materia biodegradable¹¹⁹.

1.6.2 Gallinaza. La gallinaza es una mezcla de excremento de las gallinas, con los materiales que se usan para la cama en los gallineros. Es un abono orgánico muy estimado por su elevado contenido en elementos fertilizantes, la composición del estiércol no es homogénea ya que depende de la raza, la edad, la ración alimenticia y el manejo que se le haya dado al estiércol después de su excreción¹²⁰.

¹¹⁷ SAÑUDO, B. y CASTILLO, G. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas, 1994. 55 p.

¹¹⁸ LABRADOR, J. La materia orgánica en los sistemas agrícolas: Manejo y utilización. España: s.n., 1993. v. 3, 11 p.

¹¹⁹ DUQUE, R. La lombricultura. En: Revista esso agrícola. Colombia. Vol. 35, No. 2 (oct. 1988); 14 p.

¹²⁰ ACHICANOY MARTÍNEZ, A. Estudio comercialización de abono orgánico en el Municipio de Pasto. Pasto, Colombia, 1998, 29 p. Trabajo de grado (Ingeniera Agrónoma). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

1.6.3 Compost. La elaboración del compost consiste en esencia, en la descomposición de restos vegetales y animales, en montones antes de su aplicación al suelo. La mezcla puede ser de estiércol con tamo, hojas, aserrín, basuras o residuos de cosecha, los cuales sufren un proceso de descomposición. El medio por el cual se logra tal propósito es a través de la actividad de los microorganismos (hongos y bacterias) en condiciones de muy buena aireación¹²¹.

Las características de los sustratos orgánicos que podrían utilizarse para la cría de nematodos son:

- Disminuyen el efecto de cambios bruscos de temperatura y humedad en el suelo.
- Eleva la capacidad Buffer del suelo (capacidad del suelo de resistir cambios de pH).
- Aumenta la capacidad de intercambio cationico y la actividad biótica del suelo.
- Produce algunos compuestos como carbohidratos y sustancias afines, proteínas y sus derivados, grasas y afines, ligninas, sustancias taninos y resinas y ácidos orgánicos.
- Aportan y contribuye al mantenimiento y desarrollo de la micro flora y micro fauna del suelo.
- Ayudan a mejorar la estructura del suelo, lo vuelven menos pesado, mejora el drenaje y permite que en éste haya más aire, lo que favorece a los organismos que viven en él.
- El contenido de materia orgánica en el suelo y la irrigación coadyuvan en la mortalidad de las larvas del coleóptero *Pompilia japonica* causadas por los nematodos¹²²

1.6.4 Consideraciones para la inoculación de nematodos entomopatógenos en el suelo. Los factores ambientales determinantes para la sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos en campo se relacionan con la temperatura, la desecación y la humedad. Independiente al aislamiento del nematodo, la

¹²¹ Ibid., p. 30.

¹²² ESTRADA, J. y LÓPEZ, M. T. Los bioplaguicidas, alternativa de autosostenibilidad en la agricultura cubana. Primer taller Latinoamericano sobre Bio-plaguicidas. Memorias. Zamorano. Honduras, 1996. 19 p.

concentración, la exposición a uno o varios hospederos y las condiciones óptimas, solamente entre un 30 a 40 por ciento de los nemátodos infectan al hospedero. Los nematodos no pueden excavar ni nadar, ellos se mueven a través de la tensión superficial que se produce en la película húmeda alrededor de las partículas del suelo¹²³.

Los nematodos poseen un movimiento propio conocido como nictación, que consiste en la prolongación posterior del cuerpo, en forma ondulatoria, quedando totalmente parado en su parte posterior, hasta el momento en el cual se prepara para el salto hacia el hospedante¹²⁴.

Si el suelo está seco no pueden realizar la búsqueda de larvas y pueden morir antes de formar la envoltura protectora dentro de la pared del cuerpo. Si el suelo está muy húmedo o anegado, los espacios entre las partículas del suelo están llenos de agua y no hay tensión superficial para permitir su movimiento. La respiración se realiza absorbiendo el oxígeno a través de la pared del cuerpo, es por ello, que cuando están sumergidos en agua, el oxígeno proviene del agua. Si están muy juntos y en grandes cantidades, como puede ocurrir cuando se aplican en suelos muy húmedos, ellos no podrán moverse del punto de aplicación y el oxígeno en el agua del suelo se usa rápidamente y se asfixian. La textura del suelo es importante como lo indica Kaya quien observó una reducción en el desplazamiento de *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaserie* y *S. carpocapsae*, cuando la proporción de arcilla y limo se incrementó en el suelo, por lo tanto el desplazamiento es mayor en suelos de textura arenosa y franco arenosa que en suelos pesados¹²⁵.

Los abonos orgánicos aportan materia orgánica al suelo que sirve de fuente de energía para los microorganismos del suelo. Algunos materiales orgánicos presentan actividad supresora frente a hongos y se utilizan para combatir hongos patógenos. La supresión puede ser biótica o abiótica y puede deberse a diversos factores, entre ellos, factores físicos relacionados con la disponibilidad de oxígeno y el drenaje, un pH inadecuado al desarrollo de los microorganismos patógenos, presencia o ausencia de elementos como el nitrógeno, Entre otros¹²⁶.

¹²³ BEDDING, R. A. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic in nematode technology into developing countries. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. v. 12, 238 p.

¹²⁴ ISHIBASHI, N. y KONDO, E. Behavior of infective juveniles. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca ratón, CRC Press, 1990. 146 p.

¹²⁵ KAYA, Op. cit., p. 105

¹²⁶ ACHICANOY, Op. cit., p. 30.

La materia orgánica puede proporcionar actividad enzimática. Parece que existen enzimas activas adsorbidas al humus o a las partículas de arcilla no ligadas a las fracciones vivas. Una de las más abundantes es la ureasa. En general las enzimas contribuyen a hidrolizar moléculas de cadena larga, haciendo disponibles para las plantas algunos elementos resultantes de la hidrólisis¹²⁷.

¹²⁷ LABRADOR, J. La materia orgánica en los sistemas agrícolas: Manejo y utilización. España: s.n., 1993. v. 3, p. 13.

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño con una temperatura promedio de 14 °C y una humedad relativa del 70% ubicado en las instalaciones de Torobajo a una altura de 2489 m.s.n.m., con 1°14'3" de latitud norte y 77°17'7" de latitud oeste.

2.2 RECOLECCIÓN DEL SUELO INFESTADO

El suelo infestado con *Steinernema sp.* se recolectó en el corregimiento de Mapachico y el municipio de Ospina, donde se registró la presencia del nematodo causando mortalidad en larvas de chisa, el cual se identificó por los síntomas que presentaron las larvas y por que al ser observadas en el estereoscopio, se apreció el nematodo en los cuerpos de los insectos e igualmente en el suelo. Posteriormente, el suelo se transportó hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño y se realizó el proceso de infestación y multiplicación del nematodo.

2.3 RECOLECCIÓN DEL SUELO LIBRE DE NEMATODOS

El suelo libre de nematodos que se utilizó para realizar los ensayos, se recolectó en el municipio de Yacuanquer y en la ciudad de Pasto en el corregimiento de Cabrera y fue adicionado al suelo infestado que se recolectó en Ospina y Mapachico a medida que se necesitaba aumentar el suelo con inóculo hasta obtener la cantidad suficiente de suelo infestado con nematodos.

2.4 RECOLECCIÓN DE LARVAS PARA LA EVALUACIÓN

La identificación de la especie se hizo mediante el uso del estereoscopio, según Londoño: "observando características propias de la especie como el tamaño de la larva de 2 a 2.5 cm de longitud, el color amarillo marrón de la cabeza, las patas delgadas y las espinas de las tibias poco predominantes, además se observó la distribución de las setas en el raster y la abertura anal de las larvas"¹²⁸.

¹²⁸ LONDOÑO, Op. Cit., p. 50.

Según Restrepo y López–Avila, “las larvas de la familia melolonthidae tienen la abertura anal angulada o en forma de “V” o “Y”. Raster con una sola palidia, transversal, pali sencillos, dirigidos hacia la abertura anal clípeo con línea transversal oscura, labro con surco transversal aquillado, borde anterior con proyecciones en torno a la corypha y el cuerpo es esbelto”¹²⁹.

Las larvas sanas de *Astaena sp.* utilizadas para los ensayos se recolectaron en la localidad de Yacuanquer a una altitud de 2690 m.s.n.m., con una temperatura media de 13°C y una precipitación anual de 900 mm y en la ciudad de Pasto en el corregimiento de Cabrera donde se ha detectado cultivos principalmente de trigo, papa y cebolla atacados por la plaga, se realizaron visitas entre septiembre y noviembre, época en la cual hay mayor presencia de larvas de chisa. Se seleccionaron las larvas que se encontraban en tercer ínstar (estado en el cual causan mayor daño a los cultivos) y se las depositó en forma individual en recipientes plásticos con suelo para prevenir el canibalismo generado en esta especie antes de realizar el proceso de infestación en el laboratorio.

2.5 MULTIPLICACIÓN DEL NEMATODO *Steinernema sp.*

Se recolectaron 70 larvas de chisa sanas en campo y se las llevó al laboratorio para realizar la multiplicación del nematodo y lograr una inoculación uniforme del sustrato mediante la metodología propuesta por Sañudo; *et al.*, para lo cual se colocó 7 kg de suelo contaminado con el nematodo *Steinernema sp.* recolectado en Mapachico y Ospina en recipientes plásticos con capacidad de 1000 g y se introdujo en cada uno 10 larvas sanas de chisa, se tapó no herméticamente y se realizó revisiones diarias, igualmente se aplicó agua cada vez que fue necesario para conservar la humedad del suelo requerida para la supervivencia y dispersión del nematodo, la cual debe estar a capacidad de campo (100%)¹³⁰.

Una vez lograda la infección de las larvas se recolectó aquellas muertas, para ser disectadas y observadas en el estereoscopio, después se llevó a cámara húmeda sólo las larvas que presentaron nematodos en su cuerpo.

Luego de coleccionar las larvas muertas, se dispusieron en una cámara de White, para recuperar los nematodos. El proceso consiste en un recipiente de unos 3 cm de altura en donde se colocó en el centro y en posición invertida una tapa de caja Petri de 5 cm de diámetro y 1 cm de altura, encima de esta se colocó papel filtro o papel toalla y se depositó los cadáveres frescos de larvas muertas por nematodos (máximo 20 larvas), posteriormente, se llenó con agua destilada hasta que cubrió

¹²⁹ RESTREPO y LÓPEZ–AVILA, Op. Cit., p. 43.

¹³⁰ SAÑUDO; SALAZAR y BETANCOURTH, Op. Cit., p. 96.

los bordes del papel filtro, pero sin que llegue al piso superior de la tapa de Petri, donde se habían colocado las larvas.

Todo el conjunto se tapó no herméticamente y se depositó en un estante de madera con puerta para evitar que llegue la luz, los nematodos abandonaron los cadáveres, se deslizaron sobre el papel filtro húmedo y cayeron al agua. Al día siguiente, se pudo observar los nematodos en el agua y se procedió a aislarlos quitando la caja Petri con las larvas muertas y recolectando el agua en un beaker. El proceso se repitió añadiendo agua destilada a la trampa de White hasta que los nematodos abandonaron los cuerpos de las larvas muertas casi en su totalidad (4 o 5 días) por lo tanto fue necesario revisar las trampas y extraer el agua con nematodos a diario.

Figura 2. Trampas de White



Para la cuantificación de los nematodos se utilizó el método de conteo, propuesto por Woodring y Kaya “el cual permite determinar diluciones de concentraciones requeridas a partir de una concentración determinada. Para lo anterior se tomó 1 ml de la suspensión original que fue de no menos de 1000 nematodos/ml, para formar una dilución 1:100 en agua destilada, homogenizándola manualmente por 30 segundos. De esta dilución se tomó 1 ml y se colocó en una rejilla cuadrículada, para realizar el conteo de los juveniles infectivos vivos (móviles), con la ayuda de un estereoscopio, el conteo se realizó 5 veces, por lo tanto se tomó 5 ml de la suspensión y cada mililitro se depositó en la rejilla cuadrículada para tomar el número promedio”¹³¹.

El agua con nematodos recolectada se aplicó al suelo para contaminarlo y se colocó nuevamente 10 larvas de chisa sanas por cada 1000 g de suelo, se tapó y

¹³¹ WOODRING y KAYA, Op. cit., p. 24.

en esta ocasión se realizó revisiones cada 48 horas. Una vez más las larvas muertas se recolectaron, se disectaron y se observaron en el estereoscopio, las larvas de chisa que presentaron nematodos en su cuerpo se llevaron a cámara húmeda y se aisló a *Steinernema sp.* para multiplicar el nematodo aplicando el agua con nematodos al suelo y colocando 20 larvas sanas de chisa por cada 1000 g de suelo. El proceso continuó hasta que se observó muerte total de las larvas que se colocaron en el sustrato.

Luego se mezclaron 7 kg de suelo contaminado con nematodos, producto del anterior trabajo con igual proporción de suelo libre de nematodos, para un total de 14 kg de suelo al cual se le realizó el mismo proceso anterior y una vez se observó muerte total de las larvas se lo mezcló con igual proporción de suelo libre de nematodos, para un total de 28 kg de suelo y se realizó nuevamente el mismo proceso hasta lograr muerte total de larvas.

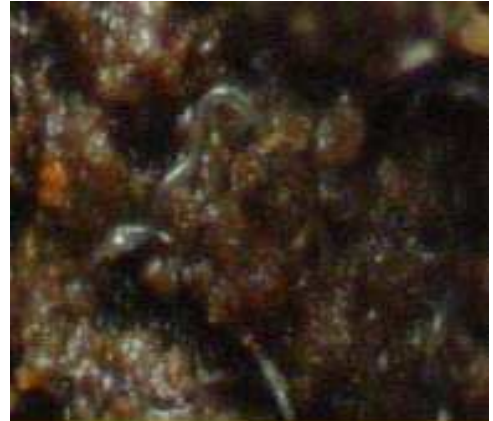
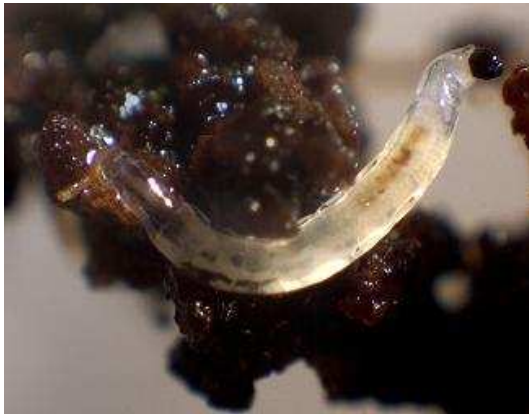
2.6 DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN DE NEMATODOS EN EL SUELO INFESTADO

Al final del proceso anterior; cuando se logró obtener 28.5 kg de suelo infestado con *Steinernema sp.* donde hubo una mortalidad total de larvas de chisa, fue necesario determinar la población de nematodos presente en el suelo por medio de la utilización del método modificado del embudo de Baermann que consiste en un embudo de tamaño mediano de vidrio, con una manguera de goma incrustada en la parte inferior y con una pinza en su extremo inferior para impedir la salida del líquido.

El embudo se llenó con agua hasta 1 cm de la parte superior, se colocó un disco de malla fina de polipropileno que soportó 100 g de suelo con inóculo envuelto en papel toalla, de tal manera que la muestra de suelo quedó cubierta parcialmente por el agua, al cabo de 48 horas, en tapas de cajas Petri se tomó pequeñas porciones de agua, abriendo la pinza que sujeta la manguera de goma conectada al embudo, se hizo la observación al estereoscopio y luego se adicionó el agua con nematodos a una rejilla cuadrículada con el fin de facilitar el conteo de los nematodos. Se determinó que había una población uniforme en el suelo infestado que estaba entre los 250 y los 300 nematodos por cada 100 g de suelo, esto permite afirmar que en un recipiente con 1000 g de suelo con inóculo y 20 larvas de chisa hay una mortalidad total de éstas, con una concentración aproximada de 2500 a 3000 nematodos.

Una vez realizado el conteo de nematodos presentes en el sustrato con inóculo se procedió a realizar los ensayos con la utilización de los sustratos orgánicos.

Figura 3. Nematodos entomopatógenos en el suelo



2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con larvas sanas de *Astaena sp.* y se estableció un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial con 3 tratamientos para el factor A y 5 tratamientos para el factor B y cinco repeticiones para cada uno. En total se obtuvieron 75 unidades experimentales.

Tratamientos del factor A

Corresponde a tres sustratos orgánicos:

1. Gallinaza
2. Lombricompost
3. Compost

Tratamientos del factor B

Corresponde a las concentraciones:

- 1 kg de sustrato orgánico (Testigo sin inóculo) (0 nematodos)
- 900 g de sustrato orgánico más 100 g de suelo con inóculo (250 a 300 nematodos)
- 700 g de sustrato orgánico más 300 g de suelo con inóculo (750 a 900 nematodos)
- 500 g de sustrato orgánico más 500 g de suelo con inóculo (1250 a 1500 nematodos)
- 1 Kg de suelo con inóculo (Testigo con inóculo) (2500 a 3000 nematodos)

Para cada concentración se realizó cinco repeticiones y para cada una se volvió a contar el número de nematodos.

Una vez realizado el conteo de nematodos presentes en las concentraciones se procedió a colocar las larvas sanas de *Astaena sp.* colectadas en Yacuanquer y Cabrera en cada uno de los recipientes plásticos con capacidad de 1 kilo a una profundidad de 5 cm. cubriéndolas con suelo. Al final se obtuvo 75 recipientes plásticos cada uno con la mezcla correspondiente y con 10 larvas sanas de *Astaena sp.*

Figura 4. Larvas de *Astaena sp.* en los recipientes plásticos



2.8 VARIABLES DE RESPUESTA

2.8.1 Evaluación de la mortalidad. La evaluación se realizó a las 96 horas después de montado el ensayo y se determinó los síntomas que presentaron las larvas a causa del patógeno y la mortalidad de las mismas.

Mortalidad larval (% M). Con base en la población original y la población afectada por el nematodo en cada uno de los tratamientos.

$$\% M = \frac{\text{Población inicial} - \text{Larvas vivas por tratamiento}}{\text{Población inicial}} \times 100$$

Eficacia de cada tratamiento (% E). Se utilizaron los resultados obtenidos en la variable anterior (% M) y ajustados mediante la aplicación de la fórmula de Abbott

$$\% E = \frac{\% M \text{ en el tratamiento} - \% M \text{ del testigo}}{100 - \% M \text{ del testigo}} \times 100$$

2.8.2 Evaluación de los sustratos orgánicos. Los resultados que arrojaron las evaluaciones de mortalidad ayudaron en la evaluación de los sustratos orgánicos.

Los criterios de selección fueron de un porcentaje de eficacia mayor del 50% para cada tratamiento, si el porcentaje fue menor de este rango en los tratamientos realizados para cada sustrato orgánico evaluado, se cataloga que el tratamiento no es un medio que brinde una adecuada capacidad infectiva al nematodo *Steinernema sp.*

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La interpretación estadística de los datos recolectados, se realizó mediante el análisis de varianza y para la comparación de medias se realizó la prueba de Duncan al 0.5 %. Los datos de mortalidad y eficacia de cada tratamiento fueron transformados mediante la fórmula $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{X}$.

Según Legarda; et al., "se transforma los datos en porcentaje para que el modelo matemático sea aditivo y lineal y los errores tengan una distribución normal, con media cero y varianza común"¹³².

¹³² LEGARDA, L.; LAGOS, T. y VICUÑA, L. Diseño de experimentos agropecuarios. Pasto, Nariño: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1991. 38 p.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS EN LARVAS

El seguimiento que se realizó permitió observar síntomas en las larvas infectadas que se iniciaban entre el primero y segundo día después de haber colocado las larvas de chisa en los recipientes con suelo con inóculo. Dichos síntomas se manifestaron con poca movilidad, pérdida de apetito y una ligera decoloración, al cabo del tercero y cuarto día las larvas mueren por septicemia permaneciendo intactas, flácidas, de un color café oscuro y sin presentar mal olor.

Figura 5. Larvas de *Astaena sp.* sanas

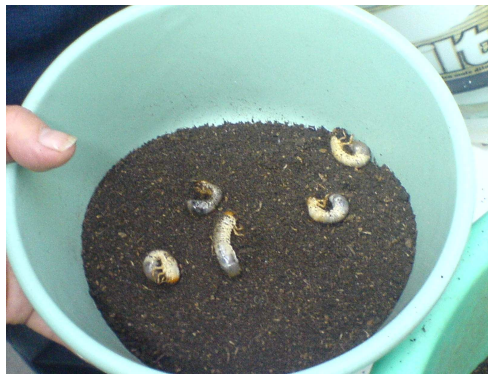


Figura 6. Larvas de *Astaena sp.* infectadas con *Steinernema sp.*



Figura 7. Juveniles infectivos de *steinernema sp.*

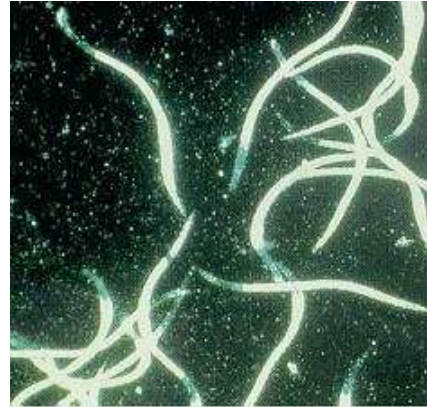


Figura 8. *Steinernema sp.* a. Macho, b. hembra

a.



b.

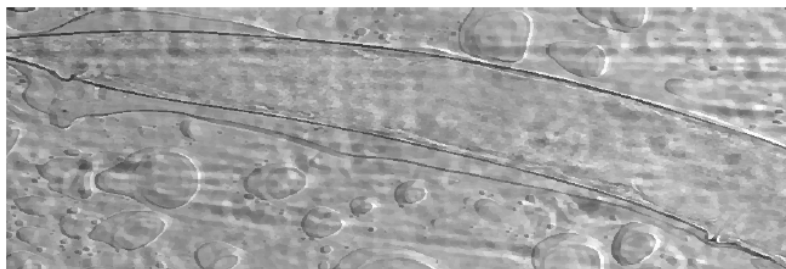


Figura 9. Larva disectada



Según Sambeek y Wiesner, “las interacciones moleculares entre los nematodos, la bacteria y el insecto hospedero llevan al deterioro de la defensa del hospedero sin conocerse certeramente una respuesta defensiva¹³³”.

Akhurst y Dunphy encontraron que:

La cutícula del estado infectivo del nematodo (IJ), que es el que penetra en el insecto, no es reconocida por el sistema inmune del hospedero, debido probablemente a la composición lipídica de la superficie de esta cutícula. Adicionalmente, la composición proteica de la membrana de las bacterias liberadas por el nematodo, parece no ser reconocida por el hospedero, debido a que los hemócitos no presentan adherencia a la membrana exterior¹³⁴.

Sin embargo Peters y Ehlers demostraron que:

El nematodo no es reconocido por el sistema inmune del insecto, pero la bacteria simbiote si, al ser liberada y comenzar su proceso de multiplicación. En un experimento, al infectar la hemolinfa de adultos de *Tipula oleracea* con el nematodo *Sterinernema feltiae* y su bacteria simbiótica *Xenorabdus bovienii*, encontraron que los procesos de encapsulación del nematodo aumentaron, pero al aplicar nematodos axénicos (sin bacteria) se presentó una reducción drástica en la

¹³³ SAMBEEK, J. V. y WIESNER, A. Successful Parasitation of Locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with Inhibition of Insect Phagocytes. In: Journal of Invertebrate Pathology. Estados Unidos. Vol. 73 (ago. 1999); 157 p.

¹³⁴ AKHURST, R. J. y DUNPHY, G. B. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N. and FREDERIC, B. A. Parasites and pathogens of Insects. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, 18 p.

encapsulación, demostrando que el nematodo pasa desapercibido por el sistema inmunológico del insecto y una vez libera la presencia de la bacteria activa la respuesta defensiva del sistema inmune del insecto¹³⁵.

Sambeek y Wiesner afirman que:

El contacto entre los hemócitos y las bacterias puede ser inhibido por mecanismos que desarrollan las mismas bacterias, aún prácticamente desconocidos. Estos mecanismos de anulación que reducen la respuesta celular del hospedero, en principio se debe a la rápida reacción bacteriana en la fase inicial de la infección, cuando comienzan a multiplicarse (septicemia) o a la acción de inmunoinhibidores como toxinas liberadas por los nematodos y/o las bacterias en una fase posterior, aunque este aspecto no ha sido del todo comprobado¹³⁶.

Por otra parte Gillespie; et al. afirman que: “las secreciones del complejo nematodo-bacteria, son las responsables de suprimir la actividad de la proteína antibacterial Cecropin presente en la hemolinfa del hospedero, como una defensa humoral”¹³⁷.

En un estudio Sambeek y Wiesner observaron que:

El fuerte impacto parasítico del nematodo *Heterorabditis megidis* (Rhaditida: Heterorhabditidae) suprime los mecanismos de defensa de la langosta *Locusta migratoria*. El estado adulto de la langosta murió 35 horas después de ser infectadas por el nematodo *H. megidis*. La defensa Humoral se detectó levemente en las primeras horas después de la infección, sin presentarse actividad supresora perceptible contra la bacteria simbiótica del nematodo *Photorabdus luminensis*. En contraste, la defensa celular estuvo influenciada por la parasitación y septicemia bacteriana después de 12 horas del inicio de la infección por el nematodo, donde entraron en actividad los hemócitos fagocíticos los cuales fueron inhibidos por los compuestos bacteriales de *P. luminescens*. Actualmente no se ha podido establecer que mecanismos de virulencia emplean la bacteria para causar estas inhibiciones¹³⁸.

¹³⁵ PETERS, A. y EHLERS, R. U. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 69 (sep. 1997); p. 218 – 222.

¹³⁶ SAMBEEK y WIESNER, Op. cit., p. 159.

¹³⁷ GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. y TRENCZEK, T. Biological mediators of insect. In: Annual Review of Entomology. Vol. 42 (nov. 1997); 633 p.

¹³⁸ SAMBEEK y WIESNER, Op. cit., p. 159.

De acuerdo con Dunphy y Thurston: “Los lipolisacaridos bacterianos (LPS) han demostrado poseer toxicidad sobre los hemócitos y se cree que son los responsables de su muerte de hecho ratificado en algunos experimentos con lepidópteros”¹³⁹.

3.2 VARIABLES DE RESPUESTA

3.2.1 Evaluación de la mortalidad. En el análisis de varianza (Anexo A) se encontró que existen diferencias significativas entre los abonos orgánicos, diferencias altamente significativas entre las concentraciones y diferencia no significativa en la interacción de los abonos orgánicos por las diferentes concentraciones de inóculo, por lo tanto, se concluye según Legarda; et al. que: “Los factores actúan independientemente y se deben escoger los mejores tratamientos dentro de cada factor comparando las medias”¹⁴⁰.

La prueba de significancia de Duncan (Anexos B, Tabla 1), indica que al comparar las medias los mayores porcentajes de mortalidad en larvas de *Astaena sp.* fueron de 73.18%, el cual se obtuvo con el suelo con inóculo (Testigo con inóculo) y de 70.16% con la concentración 500 g de abono orgánico más 500 g de suelo con inóculo, sin presentar diferencias entre estos. El menor porcentaje de mortalidad se obtuvo con el tratamiento donde se utilizó 900 g de abono orgánico más 100 g de suelo con inóculo con un 49.35%.

Esto se debe a que el suelo con inóculo (testigo con inóculo) contiene un mayor número de nematodos que las demás proporciones mezcladas (abono orgánico más suelo con inóculo) en las cuales la mortalidad aumenta a medida que la proporción de suelo con inóculo también aumenta. Sornoza afirma que: “este efecto se debe a que existe una relación directa entre la cantidad de inóculo y la infectividad del patógeno, garantizando una mayor oportunidad para que el nematodo cause infección cuando el inóculo es mayor, observándose una respuesta directamente proporcional entre el incremento de la dosis y la mortalidad de los individuos estudiados”¹⁴¹.

¹³⁹ DUNPHY, G. B. y THURSTON, G. S. Insect immunity. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. 318 p.

¹⁴⁰ LEGARDA, LAGOS y VICUÑA, Op. cit., p. 207

¹⁴¹ SORNOZA, S. D. Cría masiva de *Neoplectana sp.* (Rhabditidae: Neoplectanidae) en laboratorio y su efecto contra *Sagalassa valida* Walter en palma africana. Manabí, Ecuador, 1991, 97 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica.

En el presente estudio los porcentajes de mortalidad presentaron una tendencia a aumentar en la medida en que las concentraciones se incrementaron, de tal manera que las dos concentraciones más altas se destacaron por generar porcentajes de mortalidad más elevados, como es el caso de las concentraciones del suelo con inóculo o testigo con inóculo con 2500 a 3000 nematodos/recipiente plástico y las concentraciones de abono orgánico más suelo con inóculo con 1250 a 1500 nematodos/recipiente plástico.

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad corregida de cuatro concentraciones de abono orgánico y suelo con *Steinernema sp.* (Rhabditida: Steinernematidae) en el control de *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae) en condiciones de laboratorio. Datos transformados mediante la fórmula $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{X}$.

PORCENTAJE DE MORTALIDAD ± ERROR ESTANDAR				
CONCENTRACIÓN	COMPOST	GALLINAZA	LOMBRICOM.	PROMEDIO
900 g abono orgánico + 100 g suelo con inóculo	53.56 ± 4.03	48.66 ± 3.02	45.82 ± 3.57	49.35 ± 1.75
700 g abono orgánico + 300 g suelo con inóculo	57.38 ± 3.38	61.09 ± 3.01	52.90 ± 6.13	57.12 ± 1.83
500 g abono orgánico + 500 g suelo con inóculo	72.92 ± 7.57	72.75 ± 4.83	64.80 ± 7.62	70.16 ± 2.07
1kg suelo con inóculo (Testigo con inóculo)	72.56 ± 4.85	78.30 ± 4.79	68.67 ± 5.56	73.18 ± 2.17
Promedio	64.11 ±	65.2 ±	58.05 ±	

El porcentaje de mortalidad de los tres abonos orgánicos mezclados a diferentes concentraciones con suelo con inóculo indica que el compost, la gallinaza y el lombricompost tienen en promedio un porcentaje de mortalidad mayor del 50% sobre las larvas de *Astaena sp.*, con un 64.11, 65.2% y 58.05% respectivamente (Tabla 1).

Según Kaya “Lo anterior se debe a que el hábitat mas apropiado para los nematodos es el suelo, el cual los protege de las condiciones ambientales externas y ofrece todo el potencial para su establecimiento y reproducción”¹⁴². El suelo en este caso fue mezclado con abono orgánico o presentó un porcentaje de materia orgánica que permitió mejorar las condiciones físicas del suelo como la humedad, la textura, la temperatura y la concentración de oxígeno indispensables para la supervivencia, actividad parasítica, infectividad y dispersión de los nematodos.

Peña y Lucero afirman que: “La materia orgánica mejora las condiciones físicas y químicas del suelo, proporciona una fuente de energía a los microorganismos, contribuye a la conservación de la humedad y se constituye en el alimento para multiplicar los microorganismos que controlan la chisa”¹⁴³.

Labrador afirma que:

Un suelo provisto de materia orgánica humificada es un suelo más aireado, menos sensible a la sequía y con mayor capacidad biológica ya que el humus sirve de alimento a una multitud de microorganismos que hacen del suelo un medio vivo. Los suelos ricos en humus se calientan más y mantienen un régimen térmico más estable, reducen las variaciones bruscas del pH y ello es fundamental en los suelos agrícolas, por los efectos negativos que conllevaría la variación brusca del pH sobre la vida microbiana¹⁴⁴

La cepa de *Steinernema sp.* utilizada para este ensayo es una cepa nativa que fue tomada de un suelo donde se había estado multiplicando el nematodo con larvas de chisa y bajo condiciones ambientales favorables para su desarrollo y multiplicación, por lo tanto presenta una mayor actividad y capacidad patogénica que si hubiera sido aislada y almacenada en laboratorio.

¹⁴² KAYA, Op. cit., p. 102.

¹⁴³ PEÑA y LUCERO, Op. cit., p. 14.

¹⁴⁴ LABRADOR, Op. cit., p. 17.

Kung et al. “Considera que las condiciones de humedad edáfica, humedad relativa y temperatura del suelo afectan la efectividad de los nematodos”¹⁴⁵ y según Koppenhofer et al., “las diferentes especies de nematodos son afectadas de diferentes maneras por las bajas humedades del suelo”¹⁴⁶, es probable que *Steinernema sp.* estaría en mejores condiciones ambientales para controlar a *Astaena sp.* en ambientes fríos, ya que esta especie proviene de una región fría, adaptada a temperaturas bajas, con precipitación pluvial de 1040 mm/año, temperaturas de 12 °C y expuesta a periodos húmedos durante la mayor parte del año, lo que indica que esta bien adaptada a regiones frías, además, la humedad relativa probablemente favoreció a esta especie, pues se demostró que la habilidad de infección no decrece con la humedad, cuenta además con una buena actividad y puede vivir por largos periodos de tiempo en el suelo.

Según kung et al. “La temperatura a la que se realizó la investigación (15 °C) al parecer favoreció la infección de los nematodos sobre las larvas de chisa, además el suelo arenoso que se utilizo para su multiplicación permitió que el nematodo tenga un mejor desempeño y mayor persistencia”¹⁴⁷.

Según lo planteado por kung et al. “La textura del suelo afecta la efectividad, movilidad y sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos, ya que el tamaño de los poros y el bajo nivel de oxígeno son los factores que afectan a los nematodos”¹⁴⁸.

Gruner et al, afirma que: “Las diferencias en las propiedades del suelo pueden influir en la sobrevivencia e infectividad de los nematodos. Las especies de nematodos entomopatógenos presentan baja sobrevivencia en suelos con contenidos de arcilla superior al 20 %; en este trabajo, el suelo que se utilizo presentó textura arenosa, por lo que se considera que este factor no afecto la sobrevivencia de los nematodos”¹⁴⁹. Aparentemente la textura del suelo fue determinante para la dispersión e infectividad de *Steinernema sp.*, pues la textura de arcilla o limo puede limitar los movimientos de este nematodo.

¹⁴⁵ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990, Op. cit., p. 405.

¹⁴⁶ KOPPENHOFER, A. M.; KAYA, H. K. and TAORMINO, S. P. Infectivity of Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different Soil Depths and moistures. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 65, No. 2 (mar. 1995); 196 p.

¹⁴⁷ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1990 Op. cit., p. 405

¹⁴⁸ KUNG, GAUGLER and KAYA, 1991 Op. cit., p. 244.

¹⁴⁹ GRUNER, D. S.; RAM. K. and STRONG. D. R. Soil mediates the interaction of coexisting entomopathogenic nematodes with an insect host. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 94, No. 1 (jan. 2007); 16 p.

Campbell afirma que:

El factor más grande que puede influir en la eficacia de los nematodos es la persistencia; dado que los entomopatógenos tienen una alta distribución, se puede deducir que presentan una alta capacidad de persistencia en su hábitat natural, el suelo, puesto que los extremos ambientales son menos severos en el suelo, donde muchos nematodos pueden responder a la baja humedad al entrar en anhidrobiosis y el suelo representa una protección para la radiación solar; la eficacia puede ser reducida cuando las aplicaciones se realizan sobre el suelo, donde los juveniles están expuestos a la radiación solar y desecación a menos que éstos emigren rápidamente al suelo protector¹⁵⁰.

Fernández; et al., afirma que: “para larvas de *Galleria mellonella* se necesitan aproximadamente 20 nematodos por larva para ocasionar su infección ya que muchos nematodos generan poca progenie por competencia o contaminación”¹⁵¹.

En el presente estudio en la proporción 900 g de abono orgánico más 100 gr de suelo con inóculo hay de 250 a 300 nematodos, en la proporción 700 g de abono orgánico más 300 g de suelo con inóculo hay de 750 a 900 nematodos, en la proporción 500 g de abono orgánico más 500 g de suelo con inóculo hay de 1250 a 1500 nematodos y en 1000 g de suelo con inóculo hay de 2500 a 3000 nematodos. Si cada recipiente plástico contenía 10 larvas, la cantidad de nematodos por larva fue de 25 a 30; 75 a 90; 125 a 150 y 250 a 300 nematodos/larva respecto a las mezclas anteriores.

De lo anterior se desprende que el uso de nematodos entomopatógenos en el control de *Astaena sp.* puede ser una alternativa viable y económica, pues se requeriría utilizar bajas cantidades de nematodos.

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con Kaya en el sentido de que “los insectos en su estado larvario son altamente susceptibles a los nematodos entomopatógenos Steinernematidae y Heterorhabditidae”¹⁵². Las diferencias en los porcentajes de mortalidad obtenidos con las diferentes concentraciones de abono orgánico más suelo con inóculo pueden deberse a la susceptibilidad particular del hospedante o a los atributos de patogenicidad manifestados por *Steinernema sp.*

¹⁵⁰ CAMPBELL, J. Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae y Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turf grass. In: Biological Control. Vol. 5 (abr. 1995); 600 p.

¹⁵¹ Ibid., p. 600.

¹⁵² KAYA, Op. cit., p. 98.

Según Gullan y Kosztarab:

En lo que respecta a la susceptibilidad de los hospedantes, se conoce que estos han desarrollado mecanismos de defensa en contra de los patógenos, que pueden ser morfológicos, fisiológicos y conductuales. Los mecanismos de defensa morfológicos que pudieron influir en los diferentes porcentajes de mortalidad encontrados en este estudio, con las diferentes concentraciones de abono orgánico más suelo con inóculo son: partículas densas del suelo, espiráculos con placas de cedazo o con múltiples membranas y superficies del cuerpo endurecidas para dificultar la invasión de los nematodos¹⁵³

Forscler y Gardner afirman que:

En lo que refiere a mecanismos de defensa fisiológicos de los insectos, no se puede descartar la posibilidad de que algunos de los juveniles infectivos hayan sido eliminados durante el proceso de invasión o en el interior del hospedante por mecanismos fisiológicos, ya que cuando los patógenos invaden un organismo, los hemocitos se unen a estos y los aíslan por fagocitosis, atrapándolos en agregados llamados nódulos; pero cuando, el invasor es muy grande para ser fagocitado, es encapsulado por múltiples capas de hemocitos y/o una capa de melanina y se presenta una respuesta humoral contra la bacteria simbiote¹⁵⁴.

¹⁵³ GULLAN, P. y KOSZTARAB, M. Adaptations in scale insects. In: Annual review of entomology. Vol. 42 (jul. 1997); 34 p.

¹⁵⁴ FORSLER, B. y GARDNER, W. Parasitism of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. In: Journal Invertebrates Pathology. Vol. 58 (dic. 1991); 399 p.

Kaya afirma que:

Los mecanismos de defensa conductual pudieron haber influido para evitar la infección. Las larvas pudieron haber defecado en mayor grado para reducir la infección por el ano, reducir la producción de bióxido de carbono y liberarlo de tal manera que se evite su salida de forma explosiva y de esta manera minimizar los olores químicos. Las larvas de *Astaena sp.* tienen la tendencia a enterrarse en el suelo y la profundidad a la que se entierran depende de la textura del suelo. Este fenómeno limita la probabilidad de contacto con los nematodos a pesar de que estos pueden responder a estímulos, como moverse a través de un gradiente de CO₂ producido por las larvas, ser atraído por las heces o por la presencia del hospedante¹⁵⁵

3.2.2 Evaluación de los sustratos orgánicos. Los abonos orgánicos se comportaron de la misma manera con cualquiera de las concentraciones, por lo tanto, con cualquiera de ellos se va a obtener buena capacidad infectiva de los nematodos sobre las larvas de *Astaena sp.*, existiendo en general una relación directamente proporcional entre la concentración de nematodos y la mortalidad de las larvas, pues a medida que aumentó la concentración de nematodos infectivos, se incrementó la mortalidad de las larvas de chisa.

Los tres abonos orgánicos utilizados (gallinaza, lombricompost y compost) permiten que el suelo con inóculo active principalmente los procesos de los microorganismos que ahí se encuentran ya que favorecen la estructura, aireación y capacidad de retención de humedad del suelo.

Según Achicanoy: “Los abonos orgánicos utilizados permiten una buena circulación del agua y del aire en el suelo, se obtiene un aumento de la permeabilidad, mayor capacidad de retención de agua y menor cohesión del suelo favoreciendo por ende también a los nematodos presentes en el suelo que necesitan de los factores externos para poder ejercer acción infectiva sobre las larvas de chisa”¹⁵⁶.

La capacidad infectiva de *Steinernema sp.* sobre las larvas de chisa bajo los diferentes sustratos orgánicos se determinó por medio de la eficacia de cada tratamiento, por lo tanto para el caso del compost se determinó que todos los tratamientos presentan una buena capacidad infectiva ya que tienen un porcentaje de eficacia mayor del 50%, por lo cual el compost es un medio que brinda una

¹⁵⁵ KAYA, H. Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes: Food and fertilizer tech center. San Diego: Academic Press, 1993. 3 p.

¹⁵⁶ ACHICANOY, Op. cit., p. 99.

adecuada capacidad infectiva al nematodo *Steinernema sp.* sobre las larvas de *Astaena sp.* (Tabla 1).

En la gallinaza se determinó que todas las concentraciones presentan una buena capacidad infectiva ya que tienen un porcentaje de eficacia mayor del 50% a excepción del tratamiento 900 g de abono orgánico más 100 g de suelo con inóculo que presentó un porcentaje de eficacia del 48.66%, por lo cual la gallinaza es un medio que brinda una adecuada capacidad infectiva al nematodo *Steinernema sp.* sobre las larvas de *Astaena sp.* cuando el tratamiento es de 700 g de gallinaza más 300 g de suelo con inóculo; 500 g de gallinaza más 500 g de suelo con inóculo y 1 Kg de suelo con inóculo (testigo con inóculo) (Tabla 1).

En el lombricompuesto se determinó que todas las concentraciones presentan una buena capacidad infectiva ya que tienen un porcentaje de eficacia mayor del 50% a excepción del tratamiento 900 g de abono orgánico más 100 g de suelo con inóculo que presentó un porcentaje de eficacia del 45.82%, por lo cual la gallinaza es un medio que brinda una adecuada capacidad infectiva al nematodo *Steinernema sp.* sobre las larvas de *Astaena sp.* cuando el tratamiento es de 700 g de lombricompuesto más 300 g de suelo con inóculo; 500 g de lombricompuesto más 500 g de suelo con inóculo y 1 Kg de suelo con inóculo (testigo con inóculo) (Tabla 1).

Los sustratos orgánicos favorecieron el proceso de infección de los Steinernematidos sobre las larvas de *Astaena sp.* por que permitieron que estos organismos se desplacen mas fácilmente por el suelo, debido a que muchas de las barreras que dificultan la localización del hospedante fueron mejoradas al adicionar este abono como son la humedad, la temperatura, la aireación, entre otros. Si se logra mejorar estas condiciones físicas del suelo es posible favorecer la supervivencia o prevalencia del nematodo y lograr la infección de las larvas de *Astaena sp.*

El comportamiento de los nemátodos fue muy dinámico y estuvo relacionado con las condiciones ambientales, siendo favorecido por la humedad y el abono orgánico. En general, el abono orgánico modificó el micro ambiente favoreciendo la población de nematodos, generando cambios en la aireación, estructura y ciclaje de nutrientes en el suelo por el aporte de materia orgánica.

Según Glazer la eficacia de los nematodos entomopatógenos difiere significativamente en el mismo insecto objetivo. Estas diferencias se han atribuido a:

- La variación entre las cepas de nematodos y la actividad de los IJ en el suelo; aunque los nematodos se pueden desarrollar muy bien en muchas especies de hospedantes diferentes, el desarrollo optimo difiere con la especie o cepa de nematodo.

- El número de bacterias por infectivo juvenil. En *Steinernema carpocapsae* varía de 20 a 250 células y la virulencia de la bacteria simbiote está influenciada por el porcentaje de crecimiento de la bacteria y la actividad de las enzimas proteolíticas.
- La proporción de juveniles que lleva el hospedante; el porcentaje de invasión de nematodos al hemocele del insecto es el factor más importante que afecta la patogenicidad global de Steinernematidos y Heterorhabditidos y el tiempo que tardan para liberar las bacterias. De aquí se desprende la necesidad de evaluar el efecto de la concentración de nematodos en una especie de insecto determinado.
- El tamaño del insecto hospedante.

4. CONCLUSIONES

Bajo condiciones controladas de laboratorio el nematodo entomopat6geno *Steinernema sp.* es capaz de infectar y parasitar larvas de tercer 6nstar de *Astaena sp.*

La metodolog6a utilizada para la multiplicaci6n del nematodo es eficiente para obtener una inoculaci6n uniforme del sustrato, mantener el nematodo en constante actividad y obtener una cantidad considerable de nematodos infectivos en corto tiempo.

Esta investigaci6n demostr6 que existen diferencias en los porcentajes de mortalidad de las larvas de *Astaena sp.* con las diferentes concentraciones de la cepa nativa *Steinernema sp.*, de tal manera que a mayor concentraci6n de nematodos mayor porcentaje de mortalidad.

Los resultados obtenidos en esta investigaci6n sugieren que las concentraciones evaluadas en este estudio representan una alternativa no t6xica o residual, ambientalmente aceptable y un potencial como agentes de control biol6gico en larvas de *Astaena sp.* dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

5. RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar a *Steinernema sp* bajo condiciones ambientales de campo con el fin de observar su comportamiento en infectividad, patogenicidad y persistencia en *Astaena sp*.

Estimar el costo de producción y aplicación de los nematodos entomopatógenos utilizados como agentes de control biológico en el manejo integrado de *Astaena sp*.

Evaluar el efecto de los sustratos orgánicos en la supervivencia del nematodo en el tiempo

BIBLIOGRAFÍA

ACHICANOY MARTÍNEZ, A. Estudio comercialización de abono orgánico en el Municipio de Pasto. Pasto, Colombia, 1998, 104 p. Trabajo de grado (Ingeniera Agrónoma). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

AGRIOS, G. Manual de enfermedades de las plantas. México: Limusa, 1991. v. 4, p. 583 – 756.

AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. In: Journal of General Microbiology. Vol. 121 (may. 1980); p. 303 – 309.

AKHURST, R. J. y DUNPHY, G. B. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N. and FREDERIC, B. A. Parasites and pathogens of Insects. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 1 – 23.

BEDDING, R. A. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic in nematode technology into developing countries. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. v. 12, p. 233 – 245.

BOEMARE, N.; LAUMOND, C. y MAULEON, H. The entomopathogenic nematode bacterium complex; biology, life cycle and vertebrate safety. In: Biocontrol science and technology. Inglaterra. Vol. 6, No. 3 (jun. 1996); p. 333 – 345.

BUSTILLO, A. Patogenicidad del nematodo *Neoaplectana carpocapsae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxydia trychiata*. Contribución del programa nacional de entomología del ICA. Medellín, Colombia: ICA, 1976. p. 139 – 143.

BROW, I. M. y GAUGLER, R. Temperature y humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. In: Nematologica. Vol. 43 (jun. 1997); p. 363 – 375.

CAICEDO, A.M. y BELLOTTI, A.C. Evaluación del potencial del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* W. (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Cyrtomenus bergi* F. (Hemiptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio. En: Revista colombiana de entomología. Vol. 20, No. 4 (ene. 1994); p. 241 – 246.

CAMPBELL, J. Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae y Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turf grass. In: Biological Control. Vol. 5 (abr. 1995); p. 598 – 606.

DUCEMBERY, D.B. Chemotactic behavior of nematodes. In: Journal of nematology. Estados Unidos. Vol. 15, No. 2 (mar. 1983): p. 168 – 173.

DUNPHY, G. B. y THURSTON, G. S. Insect immunity. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 301–323.

DUQUE, R. La lombricultura. En: Revista esso agrícola. Colombia. Vol. 35, No. 2 (oct. 1988); p. 13 – 15.

EHLER, L. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. 22 p.

EPSKY, N.D.; WALTER, D.E. y CAPINERA, J.I. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). In: Journal of economic entomology. Vol. 81 (nov. 1998); 821 p.

ESTRADA, J. y LÓPEZ, M. T. Los bioplaguicidas, alternativa de autosostenibilidad en la agricultura cubana. Primer taller Latinoamericano sobre Bio-plaguicidas. Memorias. Zamorano. Honduras, 1996. 22 p.

FAN, X.; MAGGIORANI, A. y GUIDIÑO, S. Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). En: Revista forestal. Vol. 44, No. 1 (sep. 2000); p. 115 – 118.

FERNÁNDEZ, E.; ARTEAGA, E. y PÉREZ, M. Utilización de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas. Ciudad de la Habana, Cuba: Laboratorio de nematología INISAV, 1998. 13 p.

FORSCLER, B. y GARDNER, W. Parasitism of Phyllophaga hirticula (Coleoptera: Scarabaeidae) by Heterorhabditis bacteriophora and Steinernema carpocapsae. In: Journal Invertebrates Pathology. Vol. 58 (dic. 1991); p. 396 – 407.

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J.F. y GUPTA, P. Characterization and basis of enhanced host – finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. In: Journal of invertebrate pathology. Vol. 57 (may. 1991); p. 234 – 241

GEORGIS, R. y MANWEILER, S. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. In: Agricultural zoology reviews. Vol. 6 (oct. 1994); p. 63 – 94.

GLAZER, I. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. In: Biocontrol science and technology. Vol. 6 (jun. 1996); p. 373 – 378.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. y TRENCZEK, T. Biological mediators of insect. In: Annual Review of Entomology. Vol. 42 (nov. 1997); p. 611-643.

GOLD, C.S. y MESSIAEN, S. El picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus*. Bogotá: Inibap. Plagas de musa, 2000. 5 p. (Hoja divulgativa; no. 4).

GULLAN, P. y KOSZTARAB, M. Adaptations in scale insects. In: Annual review of entomology. Vol. 42 (jul. 1997); p. 23 – 50.

GRUNER, D. S.; RAM, K. and STRONG, D. R. Soil mediates the interaction of coexisting entomopathogenic nematodes with an insect host. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 94, No. 1 (jan. 2007); p. 12 – 19.

ISHIBASHI, N. y KONDO, E. Behavior of infective juveniles. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca ratón, CRC Press, 1990. p. 139 – 150.

JIMÉNEZ GÓMEZ, J. Utilización de agentes microbiales en el manejo integrado de plagas. En: Manejo Integrado de Plagas. Memorias Curso Internacional. San Juan de Pasto, Colombia. 1995. p. 50 – 72

KAYA, H. Soil ecology. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 93 – 115.

_____ Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes: Food and fertilizer tech center. San Diego: Academic Press, 1993. p. 1 – 13.

KAYA, H. y GRIVE, B. The nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the beet armyworm; *Spodoptera exigua* in infective of prepupa and pupa in soil and the adults during emergence from soil. In: Journal of invertebrate pathology. Estados Unidos. Vol. 32, No. 2 (sep. 1982); p. 192 – 197.

KAYA, H. y HARA, A. Differential susceptibility of Lepidoptera pupae to infection by the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. In: Journal of invertebrate pathology. Estados Unidos. Vol. 36 (ene. 1980); p. 389 – 393.

KONDO, E. y ISHIBASHI, N. Effects of soil moisture on the survival and infectivity of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (DD - 136). In: Proceedings of the Association for Plant Protection Kvushu. Vol. 31 (feb. 1985); p. 186 – 190.

KOPPENHOFER, A. M.; KAYA, H. K. and TAORMINO, S. P. Infectivity of Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different Soil Depths and moistures. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 65, No. 2 (mar. 1995); p. 193 – 199.

KLEIN, M.G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: R. GAUGLER R and KAYA, H. K. Entomopathogenic nematodes in biological control. Florida: Boca Ratón, CRC Press, 1990. p. 195 – 214.

KUNG, S. P.; GAUGLER, R. and KAYA, H. k. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 55, No. 3 (may. 1990); p. 401 – 406.

_____ Effects of temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 57, No. 2 (mar. 1991); p. 242 – 249.

LABRADOR, J. La materia orgánica en los sistemas agrícolas: Manejo y utilización. España: s.n., 1993. v. 3, p. 2 – 23.

LEGARDA, L.; LAGOS, T. y VICUÑA, L. Diseño de experimentos agropecuarios. Pasto, Nariño: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1991. p. 39 y 200 – 232.

LIU, Q. Z. y GLAZER, I. Dissiccation survival of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. In: Phytoparasitica. Vol. 28, No. 4 (oct. 2000); p. 331 – 340.

LONDOÑO, M. La Chisa o Mojojoy: un modelo de Investigación entomológica. En: Cuarto seminario técnico regional. Rionegro, Antioquia: Corpoica. Vol. 4, No. 4 (ago. 1998); p. 48 – 55.

MARTIGNONI, M. Producción masiva de insectos. En: Control biológico de las plagas de los insectos y malas hierbas. México: CECSA, 1978. p. 679 – 715.

MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Desplazamiento y parasitismo de entomonematodos hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). En: Revista Colombiana de Entomología. Vol. 28, No. 2 (may. 2002); p. 145 – 151.

- MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. En: Boletín de sanidad vegetal. Vol. 29 (dic. 2003); p. 523 – 533.
- MONTUFAR BLANCO, E. Efectos de tres concentraciones del nematodo *Steinernema carpocapsae* y del cubrimiento del plato radicular con raquis en el control del barrenador de raíces (*Sagalassa valida w*) de palma africana de Tumaco. Pasto, Colombia, 1993, 102 p. Trabajo de Grado (Ingeniero agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- MORENO, J. Manejo Integrado del cultivo de papa. Tibaitata: Corpoica, 2000. p. 122 – 129.
- PAZOS, I. y CHECA, E. Reconocimiento e identificación de hongos entomopatógenos en chisas *Ancognatha sp.* y *Astaena sp.* (Coleoptera: Scarabaeidae) en la zona cerealera del Departamento de Nariño. Pasto, Colombia, 1990, 80 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- PEÑA, L. Investigación para el Mecen fincas de minifundios en Yacuanquer y Ospina. Proyecto PRONATA. San Juan de Pasto: Corpoica, 2001. 22 p.
- PEÑA, L. y LUCERO, A. Manejo Integrado de la chisa en el Departamento de Nariño. En: Boletín divulgativo No. 19. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural San Juan de Pasto: Corpoica, (may. 2003). 16 p.
- PETERS, A. y EHLERS, R. U. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. In: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 69 (sep. 1997); p. 218 – 222.
- POINAR JUNIOR, G. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. y KAYA, H. Entomopathogenic nematodes in biological control. Estados Unidos: Boca ratón, CRC press, 1990. p. 23 – 61.
- RESTREPO, H. y LÓPEZ–AVILA. Especies de chisas (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia. Corpoica, MIP Bogota: Produmedios, 2001. 62 p.
- RUIZ, N. y PUMALPA, N. Conozca la chisa y su control. Bogota: Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Programa de Choque Tecnológico, 1989. 7 p. (Plegable de divulgación; no. 217).
- SAMBEEK, J. V. y WIESNER, A. Successful Parasitism of Locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with Inhibition of Insect Phagocytes.

In: Journal of Invertebrate Pathology. Estados Unidos. Vol. 73 (ago. 1999); p. 154 – 161.

SÁENZ, A.; BENÍTEZ, A. y DE HARO, E. Patogenicidad y signos en larvas del barrenador de raíces de palma de aceite, *Sagalassa valida*, por nematodos entomopatógenos. En: Ceniavances. Tumaco, Nariño: Corporación Centro de Investigaciones de Palma de Aceite CENIPALMA. 2005. 106 p.

SAÑUDO, B.; SALAZAR, C. y BETANCOURTH, C. Principios de nematología agrícola. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas, 2003. 120 p.

SAÑUDO, B. y CASTILLO, G. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de ciencias agrícolas, 1994. 68 p.

SMITS, P. H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides. In: Microbial insecticides: novelty or necessity. Farham, Inglaterra: British Crop Protection Council, 1997. 302 p. (Symposium proceedings; no. 68).

SORNOZA, S. D. Cría masiva de *Neoplectana sp.* (Rhabditidae: Neoplectanidae) en laboratorio y su efecto contra *Sagalassa valida* Walter en palma africana. Manabí, Ecuador, 1991, 110 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica.

TANADA, Y. y KAYA, H. Nematodes, nematomorphs and plathelminthes. In: Insect pathology. San Diego, California: Academic Press, 1993. 666 p.

WOODRING, J. y KAYA, H. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. In: A handbook of techniques. Fayette Ville, Arkansas: Agricultural experiment station, 1988. 30p. (Southern cooperatives series; no. 331).

WOUTS, W.M. *Steinernema (Neoplectana)* and *Heterorhabditis* species. In: NICKEL, W.R. Manual de agriculture nematology. New York: Marcel Decker, 1991. p. 855 – 897.

ZUCKERMAN, B.M. y JANSSON, H.B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host – prey recognition. In: Annual review of phytopathology. Estados Unidos. Vol. 15, No. 2 (ago. 1984); p. 168 – 173.

ANEXOS

Anexo A. Análisis de varianza del Porcentaje de mortalidad corregida de *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae) en tres tipos de sustrato orgánico mezclado con diferentes concentraciones de suelo con *Steinernema sp.* (Rhabditida: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. Datos transformados mediante la fórmula $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{X}$.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
S. ORGÁNICOS	2	593.937500	296.968750	2.2816 *	0.111
CONCENT.	3	5619.046875	1873.015625	14.3902 **	0.000
INTERACCION	6	177.765625	29.627604	0.2276 NS	0.965
ERROR	48	6247.656250	130.159500		
TOTAL	59	12638.406250			

C.V. = 18.27%

* Diferencias significativas al 95%

** Diferencias altamente significativas al 95%

NS Diferencias no significativas al 95%

Anexo B. Resultados de la comparación de medias del Porcentaje de mortalidad corregida de *Astaena sp.* (Coleoptera: Melolonthidae) en tres tipos de sustrato orgánico mezclado con diferentes concentraciones de suelo con *Steinernema sp.* (Rhabditida: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. Datos transformados mediante la fórmula $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{X}$.

TRATAMIENTO	MEDIA ± E.S
1 Kg de suelo con inóculo (Testigo con inóculo)	73.18 ± 2.17 A
500 g de sustrato orgánico más 500 g de suelo con inóculo	70.16 ± 2.07 AB
700 g de sustrato orgánico más 300 g de suelo con inóculo	57.12 ± 1.83 BC
900 g de sustrato orgánico más 100 g de suelo con inóculo	49.35 ± 1.75 C

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si (Duncan al 0.05 %).

E.S (Error Estándar)