

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**HÁBITOS PARASITARIOS Y COMPORTAMIENTO DE UN AISLAMIENTO
NATIVO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO *Steinernema* sp. EN LARVAS
DE *Galleria mellonella* L.**

ANDREA INÉS ALVARADO ORELLANA

Santiago, Chile

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**HÁBITOS PARASITARIOS Y COMPORTAMIENTO DE UN AISLAMIENTO
NATIVO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO *Steinernema* sp. EN LARVAS
DE *Galleria mellonella* L.**

**PARASITIC HABITS AND BEHAVIOR OF A NATIVE ISOLATE OF THE
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Steinernema* sp. IN *Galleria mellonella* L.
LARVAE**

ANDREA INÉS ALVARADO ORELLANA

Santiago, Chile
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**HÁBITOS PARASITARIOS Y COMPORTAMIENTO DE UN AISLAMIENTO
NATIVO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO *Steinernema* sp. EN LARVAS
DE *Galleria mellonella* L.**

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniero Agrónomo
Mención: Sanidad Vegetal

Andrea Inés Alvarado Orellana

PROFESOR GUÍA	Calificaciones
Sr. Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	7,0
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Jaime Araya C. Ingeniero Agrónomo, MS., Ph. D.	6,4
Sr. Manuel Casanova P. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,7
COLABORADORA	
Sra. Patricia Flores Q. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	

Santiago, Chile
2012

A Dios

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi profesor guía Erwin Aballay, por ser el creador intelectual de esta memoria y colaborar en la realización de la misma. Al profesor Jaime Araya, por su ayuda en la redacción de este trabajo y al profesor Hernán Valenzuela por su orientación en el análisis estadístico.

A Patricia y Andrea del laboratorio nematológico de Bioagro por el apoyo brindado.

A Verónica por su amistad y por haber estado siempre conmigo entregándome sus consejos.

En especial a mi familia, al amor incondicional de mi mamá, quien ha estado siempre conmigo compartiendo mis pequeños y grandes logros. Al tío Juan por su compañía y apoyo. A mis hermanas Nicolee y Alexandra por su cariño.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de esta memoria.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

	Págs.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Obtención y reproducción de <i>Galleria mellonella</i> L.	7
Reproducción <i>in vivo</i> , almacenamiento y cuantificación de nemátodos	8
Efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción	10
Determinación de la concentración letal	11
Efecto del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción .	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción	16
Determinación de la concentración letal	20
Efecto del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción .	23
Discusión	25
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

El estado infectivo (J3) de los nemátodos entomopatógenos (NE) del género *Steinernema* (Steinernematidae) es la única etapa de vida libre, responsable de localizar a un insecto huésped susceptible y penetrar en su interior a través de las aberturas naturales, dirigirse al hemocele y liberar su bacteria simbiote del género *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae), la que se multiplica y causa la muerte del insecto huésped en 48 h por septicemia.

Para evaluar aspectos del comportamiento de un nemátodo nativo, se hicieron 3 ensayos de laboratorio. En el primero se evaluó el efecto de varias temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C), en el segundo se evaluaron suspensiones ajustadas de 10, 20, 40, 80, 120 y 240 J3 y en el tercero se evaluó un sustrato con diferentes contenidos de agua para determinar la susceptibilidad de las larvas del último instar del insecto huésped polilla de la cera, *Galleria mellonella* L. Además se determinó su progenie (J3 emergidos por larva) y su eficacia de penetración (J3 que penetraron al insecto huésped).

La larva fue altamente susceptible a la infección por estos nemátodos, con una mortalidad cercana al 100% a las 48 h en la mayoría de los tratamientos. A 20°C se obtuvo la máxima emergencia, por lo que esta temperatura resultó ser óptima para la reproducción y desarrollo del aislamiento evaluado.

La mortalidad fue afectada por efecto de la concentración. El número de nemátodos que entraron en el hospedero aumentó con la concentración de J3 inoculados. La infectividad del nemátodo fue mayor en un contenido de agua moderado del suelo, cercana a la capacidad de campo.

Se concluye que el parasitismo, progenie y eficacia de penetración del aislamiento evaluado de *Steinernema* sp. son afectados por factores abióticos como la temperatura y el contenido de agua del suelo.

Palabras clave: Rhabditida, Steinernematidae, juveniles infectivos, factores abióticos, control biológico.

ABSTRACT

The infection status (J3) of the entomopathogenic nematodes (EPN) of the genus *Steinernema* (Steinernematidae) is the only free living stage, they are responsible for locating a susceptible insect host and penetrate inside through natural openings, moving toward the hemocoel and release their symbiotic bacteria of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae), which multiply and kill the insect host after about 48 hours by septicemia.

In order to assess aspects of behavioral of a native nematode, three series of laboratory trials were conducted. In the first, several temperatures were evaluated (5, 10, 15, 20, 25, and 30°C). In the second, adjusted suspensions of 10, 20, 40, 80, 120 and 240 J3 were evaluated. In the third, a substrate was evaluated with various water contents to determine the susceptibility of last instar larvae of the insect host, the wax moth *Galleria mellonella* L. The nematode progeny (J3 emerged from each larva) and their penetration efficacy (J3 that penetrate into the insect host).

The larva was highly susceptible to infection with these nematodes, with a mortality rate approaching 100% within 48 h in most treatments. Maximum emergency occurred at 20°C, so this temperature was optimal for the reproduction and development of the EPN isolate evaluated.

Insect mortality was affected by EPN concentration. The number of nematodes that penetrated the host increased with the concentration of J3 inoculated. The infectivity of the nematode was greater in soil with moderate water content, near to the field capacity.

It is concluded that parasitism, progeny and penetration efficiency of isolate evaluated of *Steinernema* sp. were affected by abiotic factors such as the temperature and the amount of water of soil.

Keywords: Rhabditida, Steinernematidae, infective juveniles, abiotic factors, biological control.

INTRODUCCIÓN

Los nemátodos son el grupo de invertebrados más abundantes sobre la Tierra, con excepción de los artrópodos (Magunacelaya y Dagnino, 1999). Se agrupan actualmente en el *Phylum* Nematoda. Son organismos no segmentados, con forma típica de vermes cilíndricos aguzados, adelgazados en ambos extremos, en los que se ubican la cabeza y la cola en forma opuesta. Aunque no poseen aparato respiratorio ni circulatorio, la organización del cuerpo es bastante compleja, tienen un aparato digestivo adaptado a sus hábitos alimenticios, sistema excretor, aparato reproductor diferente en machos y hembras, un sistema nervioso bastante desarrollado, y órganos sensoriales en diversas partes del cuerpo (Kaya y Stock, 1997; Magunacelaya y Dagnino, 1999; Morton, 2009).

Los nemátodos son básicamente individuos móviles, dotados de una gran adaptabilidad, y pueden encontrarse en una gran diversidad de hábitats. La condición más importante para mantener su actividad es contar con un medio húmedo, por ende, pueden habitar en un suelo cultivado o no, en el agua de mar o dulce, en láminas de agua en el suelo, y pueden ser de vida libre o parásitos facultativos u obligados de plantas y animales (Magunacelaya y Dagnino, 1999; Stock *et al.*, 2008).

Entre los diversos tipos de asociaciones existentes entre nemátodos e insectos, la patogénica se caracteriza por una alta especialización, debido a que en ella sólo los nemátodos 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 hospederos que incluye la mayoría de sus órdenes (Magunacelaya y Dagnino, 1999; Griffin *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2009). Los nemátodos parásitos que matan a su insecto hospedero, se denominan “entomopatógenos” (Stock *et al.*, 2008).

Las especies entomopatógenas que han recibido mayor atención, debido a que causan la mortalidad del huésped en un período relativamente corto y a su amplio rango de hospederos, pertenecen a los siguientes grupos taxonómicos: Familia Steinernematidae, Géneros *Steinernema* y *Neosteinernema* y Familia Heterorhabditidae, Género *Heterorhabditis*, que incluyen la mayor cantidad de especies y han sido detectadas en numerosas regiones en todo el mundo (Woodring y Kaya, 1988; Morton; 2009).

Los nemátodos entomopatógenos (NE) de la familia Steinernematidae están representados por 60 especies del género *Steinernema* y una especie del género *Neosteinernema*, todas patógenos obligados de un gran número de especies de insectos (Hazir, 2001; Adams y Nguyen, 2002; Koppenhöfer y Fuzy, 2003). Presentan una relación con bacterias del género *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) (Forst y Clarke, 2002; Griffin *et al.*, 2005). Esta relación nemátodo y bacteria podría ser clasificada como mutualismo, puesto que ambos se benefician y son incapaces de mantenerse por sí mismos bajo condiciones naturales en ausencia de un insecto víctima (Magunacelaya y Dagnino, 1999). También tienen gran

capacidad de adaptación a nuevos ambientes y condiciones adversas, pueden actuar en forma sinérgica con otros patógenos y presentan un gran potencial como controladores biológicos, pueden ser cultivados *in vivo* e *in vitro*, y sobreviven por períodos largos en condiciones de almacenamiento conservando su capacidad infectiva (Sáenz y Luque, 2000; Shapiro-Ilan *et al.*, 2002; Sáenz y Olivares, 2008).

En el género *Steinernema* el estado infectivo corresponde al tercer estado juvenil (J3), también denominados *dauers*, que significa durabilidad y/o resistencia, y mantienen la cutícula del segundo estado juvenil (J2), la que le sirve como protección (Riobo, 1991; Kaya y Gaugler, 1993; Sáenz y Luque, 2000), y es el único estado que vive fuera del insecto. Durante este periodo no se alimentan, tienen la boca y el ano cerrados, sobreviven de las reservas acumuladas antes de su salida del cadáver del insecto donde se encontraba, están morfológica y fisiológicamente adaptados para sobrevivir por largos períodos en el suelo en ausencia de su hospedero. Son los encargados de localizar al hospedero de forma activa debido a diversos estímulos físicos y químicos que éste emite, entre los que destacan los gradientes de temperatura, CO₂, y productos de excreción de los insectos (García del Pino, 1994; Smart, 1995; Griffin *et al.*, 2005; Sáenz y Olivares, 2008; Stock *et al.*, 2008).

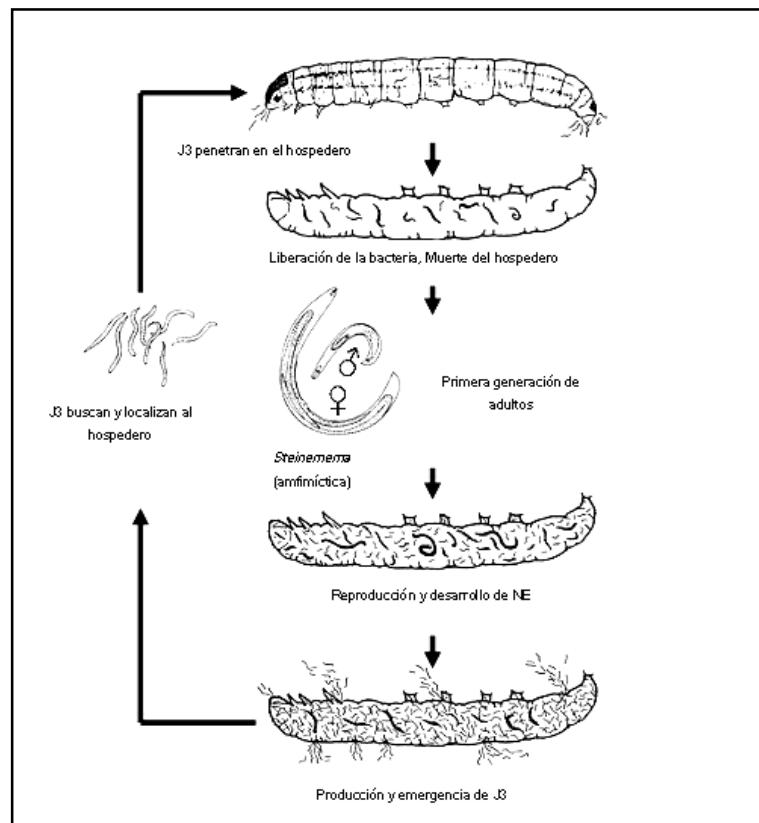


Figura 1. Ciclo biológico de *Steinernema* spp. (Koppenhöfer y Fuzy, 2008).

Los J3 transportan células de la bacteria simbiote en la porción ventricular de su intestino, en una especie de bolsa o divertículo intestinal. Una vez que el nemátodo ha localizado al insecto, debe penetrar en él a través de sus aberturas naturales (boca, ano y espiráculos), hasta alcanzar el hemocele, donde libera su bacteria simbiote al defecar; la bacteria pasa a la hemolinfa, donde se multiplica rápidamente y causa la muerte al hospedero en 24 a 48 h por septicemia. La bacteria destruye los tejidos internos del insecto, para crear un medio favorable para la alimentación y reproducción de los NE (Fan y Hominick, 1991; Kaya, 1993; Hazir *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2006; García del Pino, 1994; Stock *et al.*, 2008) (Figura 1).

Al iniciar su desarrollo, el nemátodo se alimenta de las células bacterianas y de los tejidos del hospedero que han sido metabolizados por la bacteria y tiene 1 a 3 generaciones, según los nutrientes disponibles. La bacteria produce antibióticos y otras sustancias dentro del hospedero, que inhiben a otros microbios (Hazir *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2005). Cuando los recursos alimenticios en el cadáver se agotan, se produce una nueva generación de juveniles infectivos, que tras incorporar la bacteria en su tubo digestivo, emergen a través de la epidermis del insecto hacia el suelo para buscar nuevos hospederos. Desde el cadáver del insecto pueden emerger alrededor de 150.000 o más juveniles infectivos que buscan otro hospedero para recomenzar el ciclo (Kaya y Gaugler, 1993; Strong *et al.*, 1996; Hazir *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2005; FIA, 2011).

El ciclo de vida consiste en un estado de huevo, cuatro estados juveniles (J1 a J4), separados por mudas y adultos (machos y hembras). El ciclo de vida desde la infección a emergencia de nuevos juveniles infectivos, puede proceder siguiendo una o dos rutas. Si los nutrientes suministrados son suficientes y la población no presenta hacinamiento se convierten en adultos machos o hembras de la primera generación. La mayoría de los huevos de estas hembras eclosionan y los juveniles se desarrollan a través de cada estado de vida, hasta formar machos y hembras de la segunda generación. Este ciclo de vida tarda 8 a 10 días a 24°C (ciclo largo). Si los nutrientes suministrados son insuficientes o existe hacinamiento en la población, los J3 se desarrollan hasta formar los machos y hembras adultos de la primera generación y los huevos producidos por las hembras dan origen directamente a juveniles infectivos, este ciclo tarda de 6 a 7 días (ciclo corto) (Nguyen y Smart, 1992; Sáenz y Luque, 2000; Adams y Nguyen, 2002).

Por lo tanto, para su reproducción se requiere la entrada en el hospedero de un juvenil infectivo macho y otro hembra (García del Pino, 1994; Hazir *et al.*, 2003). No obstante, para matar al hospedero sólo es necesaria la entrada de una forma infectiva, que iniciará la infección bacteriana aunque no pueda reproducirse (García del Pino, 1994).

La infección por nemátodos entomopatógenos causa un cambio de color en los cadáveres de insectos producido por la bacteria asociada. Generalmente los insectos parasitados por steinemátidos adquieren una coloración marrón, que va desde el ocre a casi negro (Sáenz, 2003).

La eficacia de los nemátodos entomopatógenos es influenciada por la especie o aislado y la susceptibilidad del insecto hospedero, pero también depende de la capacidad de penetración de los NE, número de NE liberados por hospedero, y la especie y edad del hospedero. Sin embargo, este proceso se dificulta al llevarse a cabo en condiciones naturales, donde participan además de los factores anteriores, factores abióticos como textura, contenido de agua del suelo, temperatura, aireación, exudados de las raíces de las plantas, entre otros, y factores bióticos como densidad y tamaño del hospedero, competencia inter e intra específica, enemigos naturales, entre otros (Lozano, 2001; Morton, 2009).

En Chile, el uso de los nemátodos entomopatógenos como herramienta de control es aún poco conocida. El potencial del país como fuente de NE es interesante por su amplia variedad de climas y tipos de suelo. En esta diversidad natural se han establecido microorganismos entomopatógenos adaptados a una amplia variedad de condiciones de; temperatura, salinidad, alcalinidad, humedad, altitud, entre otras (Merino y France, 2009). Las especies de NE pertenecientes al género *Steinernema*, clasificadas por análisis morfológico y molecular encontradas en Chile son *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. australe* Edgington y *S. unicornum* Edgington (Edgington *et al.*, 2010).

En el presente estudio se evaluó un aislamiento nativo (Lican Ray) de *Steinernema*. NE, procedente de un bosque de Roble ubicado en Lican Ray, localidad ubicada en la comuna de Villarrica, IX Región de la Araucanía que se ha reproducido en laboratorio por cultivo *in vivo* utilizando larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), de fácil reproducción en laboratorio y es uno de los métodos que existen para reproducir estados infectivos (J3) (Fan *et al.*, 2000).

El presente estudio planteó como objetivo general caracterizar el parasitismo, progenie y eficacia de penetración de *Steinernema* sp. aislamiento Lican Ray en *G. mellonella* bajo diferentes condiciones medioambientales.

Como objetivos específicos, se establecieron:

- a) Determinar el parasitismo de la especie *Steinernema* sp. aislamiento Lican Ray y mortalidad sobre *G. mellonella* a diferentes temperaturas.
- b) Evaluar el parasitismo, progenie y eficacia de penetración de la especie *Steinernema* sp. aislamiento Lican Ray a distintos contenidos de agua en un sustrato específico.
- c) Determinar la concentración letal de la especie *Steinernema* sp. aislamiento Lican Ray.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se hizo en el Laboratorio de Nematología Agrícola, Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, La Pintana, Santiago, y en el Laboratorio Nematológico de la empresa Bioagro S.A., Santiago.

En este estudio se hicieron 3 ensayos para cumplir con los objetivos establecidos. Previamente fue necesario realizar los siguientes procedimientos:

Obtención y reproducción de *Galleria mellonella*

Se utilizó como insecto hospedero larvas del último estado de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), de 0,2 a 0,3 g de peso, por la disponibilidad, facilidad de cría, susceptibilidad y por ser un excelente hospedero para la producción de nemátodos entomopatógenos (González, 1998; Shapiro-Ilan *et al.*, 2002). Estas larvas se criaron en el laboratorio nematológico de Bioagro, con una dieta (Divya y Sankar, 2009) (Cuadro 1), polen y trozos de cera de abeja *ad libitum*. En ellas se desarrolló la multiplicación *in vivo* de los nemátodos entomopatógenos.

Cuadro 1. Componentes de la dieta para larvas de la polilla de la cera *G. mellonella*.

Ingredientes	Cantidad (g/recipiente)
Miel líquida	62,5
Glicerina	62,5
Levadura de cerveza	25,0
Leche desnatada en polvo	25,0
Germen de trigo	25,0
Salvado de trigo	250,0
Copos de avena	62,5

Para iniciar una colonia de larvas de *G. mellonella* se las colectó desde apiarios junto con adultos para su multiplicación y reproducción. Las larvas obtenidas se pusieron en recipientes de 25 x 20 x 8 cm, con ~550 g de dieta (Cuadro 1), trozos de cera de abeja y polen para su crianza a 25°C hasta la emergencia de los adultos, los que se pasaron a nuevos recipientes con trozos de cera de abeja y polen para su oviposición, de manera de mantener la crianza del insecto. En la figura 2 se presentan los estados fenológicos de *G. mellonella* y la duración de cada etapa.

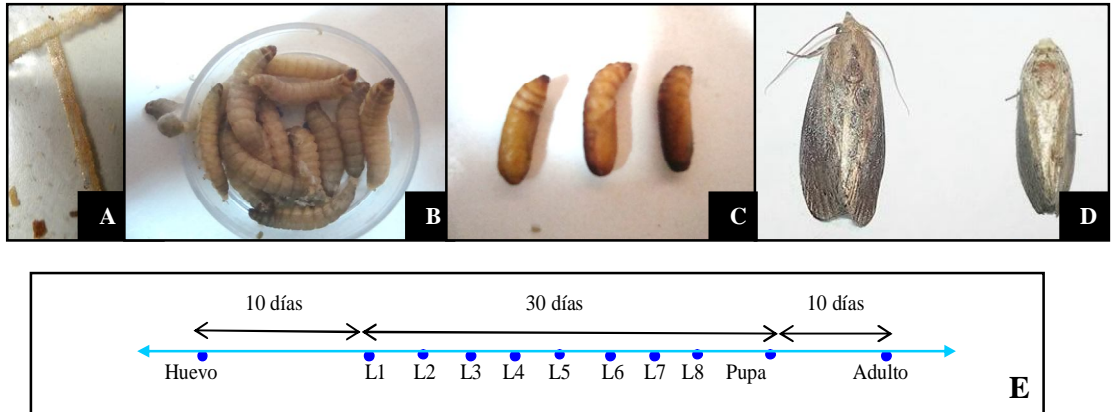


Figura 2. Estados fenológicos de *G. mellonella*. **A.** Huevo, **B.** Larva, **C.** Pupa, **D.** Adultos (hembra a la izquierda y macho a la derecha). **E.** Duración de cada estado fenológico. (L: Estados larvarios que pasa la larva durante el ciclo de vida). Modificado de Castillo *et al.* (2009).

Reproducción *in vivo*, almacenamiento y cuantificación de nemátodos

Se preparó una cámara de infección, exponiendo 10 larvas de *G. mellonella* a 1000 J3 en una placa Petri estándar (10 x 1,5 cm.) con papel filtro humedecido y se distribuyó homogéneamente 1mL de la suspensión calibrada. De este modo se tuvieron 100 infectivos juveniles por larva de *G. mellonella* (Figura 3A). Se rotuló apropiadamente, y se introdujo dentro de una bolsa plástica para mantener la humedad y finalmente se puso en una incubadora a 25 °C.

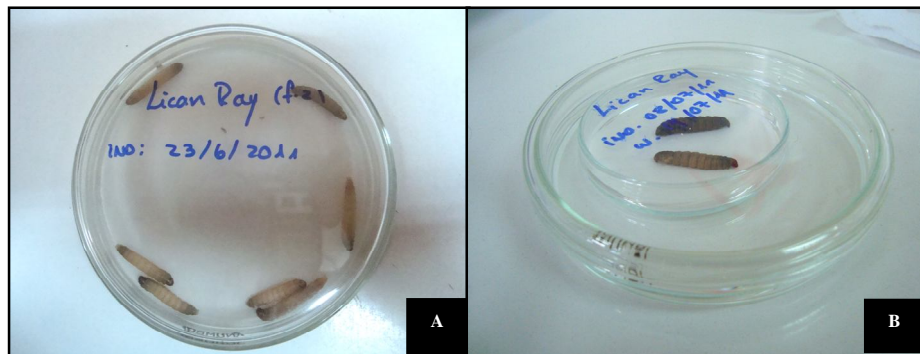


Figura 3. **A.** Cámara de infección con larvas de *G. mellonella*. **B.** Trampa de White modificada.

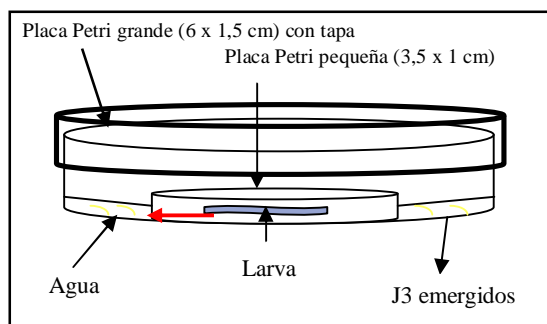


Figura 4. Modelo de una placa Petri para trampa de White modificada.

Luego de 5-7 días, las larvas muertas se removieron y pusieron en una trampa de White modificada (Figuras 3B y 4) para coleccionar los infectivos juveniles que emergieron de las larvas del insecto y que luego treparon por los bordes de la placa Petri más pequeña, para terminar cayendo en el agua de la placa externa (Stock *et al.*, 2008). La suspensión se dejó reposar 30 min a 1 h en un vaso de precipitado. Se desechó cuidadosamente el líquido sobrenadante, y se enjuagó hasta 3 veces, agregando agua destilada para desechar impurezas y J3 muertos (Woodring y Kaya, 1988). Esta suspensión limpia se llevó a frascos de tejido de cultivo de 250 mL para su almacenamiento a 10°C. Según Stock (2008), es aconsejable no prolongar la recolección por más de 3 días (contando como día 1 cuando los J3 se aprecian en el agua de la placa de mayor tamaño).

Los J3 vivos se contaron utilizando el método de recuento por dilución bajo lupa estereoscópica (Stock *et al.*, 2008), con tres repeticiones.

Las concentraciones para la inoculación de nemátodos J3 se calcularon utilizando la siguiente fórmula (Kaya y Stock 1997; Stock *et al.*, 2008):

$$A = \frac{D \times C}{B}$$

Donde:

A= volumen de la suspensión de la concentración conocida para ser diluida (mL).

B= número de nemátodos/mL de la suspensión que va a ser diluida.

C= volumen final de la nueva solución (mL).

D= concentración diluida (nº de nemátodos/mL) en la nueva dilución.

Entonces C – A= volumen de agua agregada a la nueva dilución (mL).

Efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción

El insecto se expuso a juveniles infectivos (J3) del nemátodo del aislamiento a varias temperaturas para determinar el rango en que *Steinernema* sp. podría infectar y reproducirse en *G. mellonella*.

En doce placas Petri de 3,5 x 1 cm con un disco de papel filtro estéril en la tapa (las placas se invirtieron para mejorar la circulación del aire), se puso una larva de *G. mellonella* sobre el papel filtro. Después de un aclimatamiento de 1 h de los J3 a inocular a la temperatura de evaluación, se pusieron 100 en 12 μ L de agua destilada por placa, que se cubrió con su base respectiva. Según Bedding *et al.* (1983) una prueba de 100 J3/larva es suficiente para evaluar NE como agentes de control biológico, para una plaga en particular, bajo condiciones de laboratorio. Los controles sólo contenían 12 μ L de agua destilada. Cada placa se envolvió con Parafilm® y todas se pusieron en una bandeja. Para minimizar la pérdida de humedad, las bandejas, junto con papel absorbente humedecido se pusieron en bolsas plásticas. Finalmente, la bandeja se puso en una incubadora a la temperatura de evaluación.

Para determinar el momento de muerte de las larvas de *G. mellonella*, todos los especímenes de cada bandeja se evaluaron cada 24 h, durante cinco días, el criterio de mortalidad utilizado fue considerar como larva muerta aquella que no presentaba movimiento ni capacidad de reacción al estímulo con una aguja.

Para medir la penetración (número de nemátodos J3 establecidos por larva) se disectó un grupo de larvas muertas. Cada larva muerta de *G. mellonella* se lavó con agua destilada, para remover los posibles J3 adheridos externamente a la cutícula del insecto y se puso en una placa Petri de 6 x 1,5 cm, para disectarla y contar los nemátodos en su interior.

El número de nemátodos que invadió al hospedante se determinó por disecciones del mismo. Se consideró que todos los juveniles infectivos que invaden al hospedero inician con éxito el desarrollo en éste. Por lo tanto, el número de nemátodos recuperados de la disección se considera igual al número de nemátodos que invadieron al hospedero (Epsky y Capinera, 1993).

El período de tiempo exacto para hacer la disección del hospedero varió entre los tratamientos, según el día de muerte de la larva, tres días para 5 y 10°C, dos días para 15 y 20°C y un día para 25 y 30°C.

Para medir la progenie un grupo de larvas de *G. mellonella* muertas se pusieron en una trampa de White modificada (Stock *et al.*, 2008), luego de lavar los cadáveres con agua destilada para remover los posibles J3 adheridos externamente a la cutícula larvaria.

La trampa de White modificada se debió revisar hasta que los J3 comenzaron a emerger, y emergencia se define como el día en que se observaron los primeros juveniles infectivos en salir del interior del cadáver (Brown y Gaugler, 1997). También se evaluó el tiempo de los

J3 en recorrer la distancia desde la larva hasta alcanzar el agua de la placa mayor de tamaño de la trampa de White modificada (Figura 4, flecha roja).

Los cadáveres desde los cuales no emergieron J3 después de 21 días se disectaron para determinar la causa. La emergencia desde las trampas de White se evaluó a la misma temperatura en la cual se hizo la inoculación. Se registró el primer día en que se observaron los primeros juveniles infectivos emergentes del hospedero. Una vez que éstos entraron al agua, se recogieron a intervalos regulares hasta que no hubo más infectivos juveniles, y se almacenaron a 10°C en frascos Falcon de 50 mL.

Para el recuento de los nemátodos se utilizó el método propuesto por Stock *et al* (2008), explicado antes, aunque en esta ocasión se contaron todos los nemátodos presentes en el agua, tanto vivos como muertos.

Determinación de la Concentración Letal

Se expuso una larva de último estadio de *G. mellonella* a juveniles infectivos (J3) a varias concentraciones del nemátodo a evaluar.

En catorce placas Petri de 3,5 x 1 cm con un disco de papel filtro estéril en la tapa (se usó la placa invertida para una mejor circulación del aire), se puso una larva de *G. mellonella*. Después de un aclimatamiento de 1 h de los J3 a inocular en la temperatura de evaluación elegida, de acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo de efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción, se pusieron J3 en 12 µL de agua destilada por placa a las siguientes concentraciones 0, 10, 20, 40, 80, 120 y 240 juveniles de NE. Los controles sólo contuvieron 12 µL de agua destilada. Dos placas de la bandeja se inocularon con una de las concentraciones, y se cubrieron con su base correspondiente. Cada placa se envolvió con Parafilm® y todas se pusieron en una bandeja. Para minimizar la pérdida de humedad, las bandejas, junto con papel absorbente humedecido, se introdujeron en bolsas plásticas. Finalmente, la bandeja se dejó en una incubadora a la temperatura óptima determinada en el ensayo anterior (20°C). Se aleatorizó la distribución de los tratamientos en la bandeja para mantener condiciones homogéneas entre las placas.

Para determinar el momento de muerte, todas las larvas de *G. mellonella* de cada bandeja se evaluaron cada 24 h durante cinco días; el criterio de mortalidad utilizado fue considerar como larva muerta aquella que no presentaba movimiento ni capacidad de reacción al estímulo con una aguja.

Para medir la penetración (número de nemátodos (J3) establecidos por larva). Una larva muerta por concentración se disectó dos días después de su muerte.

La eficacia de penetración (EP), el porcentaje de los nemátodos infectivos que invadió con éxito al hospedero, se calculó con la siguiente ecuación (Epsky y Capinera, 1993; Kaya y Stock 1997):

$$\% EP = \frac{\text{N}^\circ \text{ de nemátodos recuperados desde la disección}}{\text{N}^\circ \text{ de nemátodos inoculados por tratamiento}} \times 100$$

Para medir la progenie, una larva muerta de *G. mellonella* por concentración, se puso en una trampa de White modificada, como se explicó antes. Esta trampa se revisó hasta que los J3 comenzaron a emerger. O sea, emergencia se define como el día en que se observaron los primeros juveniles infectivos en salir del interior del cadáver (Brown y Gaugler, 1997).

Las larvas muertas desde los cuales no emergieron J3 después de 21 días se disectaron para determinar la causa. La emergencia desde las trampas se evaluó a la misma temperatura en la que se hizo la inoculación. Se registró el primer día en que se observaron los primeros juveniles infectivos emergentes del hospedero. Una vez que entraron al agua se recogieron a intervalos regulares hasta que no hubo más infectivos juveniles, y se almacenaron a 10°C en frascos Falcon de 50 mL

Los nemátodos se contaron por el método de propuesto por Stock *et al* (2008), de la misma forma que en el ensayo anterior.

Efecto del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción

Como sustrato se utilizó a una mezcla de arena, tierra de hojas y suelo en partes iguales, que se esterilizó 48 h a 105°C y almacenó durante al menos siete días antes de su uso. Una vez hecha la mezcla se le hizo un análisis físico (Cuadro 2), para conocer el contenido de agua necesario para que el sustrato presentara las condiciones de punto de marchitez permanente, capacidad de campo y saturación.

Cuadro 2. Resultados del análisis físico de suelo¹.

Granulometría*			Textura (USDA)	Densidad aparente (Mg/cm ³)	Retención de agua (Kpa) (% bss)		
A	L (%)	a			0	33	1500
13,2	22,9	63,9	Fa**	1,08	52,5	16,1	7,9

A:** arcilla; **L:** limo; **a:** arena; *Fa:** franco arenosa

Se expuso una larva de último estadio de *G. mellonella* a J3 de nemátodo a evaluar, obligándolos a atravesar una barrera física, una columna del sustrato elaborado, antes de encontrar al hospedero. Para ello se pusieron 4,5 g del sustrato en la base de 12 placas Petri de 3,5 x 1 cm, con 12 µL de agua destilada con J3 por placa a una concentración elegida de acuerdo a los resultados del ensayo anterior sobre el sustrato (120 J3/larva), en el control sólo con 12 µL de agua destilada. Los J3 se aclimataron a la temperatura de evaluación seleccionada en el ensayo de efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción. Luego de treinta minutos se puso una larva de *G. mellonella*. Cada placa se envolvió con Parafilm® y todas se pusieron en una bandeja, que se puso dentro de una bolsa de plástico con papel absorbente humedecido para minimizar la pérdida de humedad, y se dejó en una incubadora a la temperatura elegida según los resultados obtenidos en el ensayo de temperatura (20°C).

Para determinar el momento de muerte de *G. mellonella*, todas las larvas de cada bandeja se evaluaron cada 24 h durante cinco días, el criterio de mortalidad utilizado fue considerar como larva muerta aquella que no presentaba movimiento ni capacidad de reacción al estímulo con una aguja.

Para medir la penetración (número de nemátodos (J3) establecidos por larva) un grupo de larvas muertas se disectó dos días después de su muerte.

Para medir la progenie un grupo de larvas muertas de *G. mellonella*, se puso en una trampa de White modificada, como se explicó antes. Ésta se revisó hasta que los J3 comenzaron a emerger. O sea, emergencia se define como el día en que se observaron los primeros juveniles infectivos en salir del interior del cadáver (Brown y Gaugler, 1997).

¹ Laboratorio de Física de Suelos. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento Ingeniería y Suelos. Universidad de Chile.

Los cadáveres desde los cuales no emergieron J3 después de 21 días se disectaron para determinar la causa. La emergencia desde las trampas se evaluó a la misma temperatura en la cual se hizo la inoculación. Se registró el primer día en que se observaron los primeros juveniles infectivos emergentes del hospedero. Una vez que entraron al agua, éstos se colectaron a intervalos regulares hasta que no hubo más infectivos juveniles, y se almacenaron en frascos Falcon de 50 mL a 10°C.

Los nemátodos se contaron por el método propuesto por Stock *et al* (2008), de la misma forma que en el ensayo anterior.

Diseño experimental

Para determinar la mortalidad de las larvas de *G. mellonella*, tanto en los ensayos de efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción, y del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción, se utilizó un diseño completamente al azar con 6 tratamientos (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) y 3 contenidos de agua (capacidad de campo, punto de marchitez permanente y saturación) respectivamente con 5 repeticiones. La unidad experimental consistió en la bandeja con las 12 placas Petri (Figura 5A). Para evaluar la eficacia en la penetración y la progenie del nemátodo se disectaron 4 larvas muertas y otras 4 se pusieron en trampas separadas de White modificada por repetición, respectivamente. Cuando el porcentaje de mortalidad no superó el 20% en un tratamiento se disectaron todas las larvas muertas.

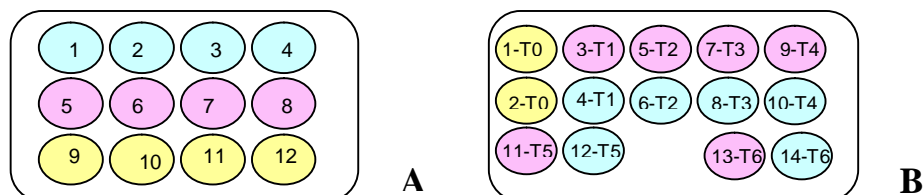


Figura 5. Disposición de las placas Petri en la bandeja para los ensayos. **A.** Efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción y Efecto del contenido de agua en el sustrato específico sobre la infectividad y reproducción. **B.** Determinación de la Concentración Letal. ● Prueba de Disección Manual (Eficacia en la penetración), ● Trampa de White modificada (Ensayo de la progenie), ● Control (sin inóculo).

En el ensayo para determinar la concentración letal se utilizó un diseño en bloques al azar, con 7 tratamientos correspondientes a 0, 10, 20, 40, 80, 120, 240 J3/12µL de agua destilada y 5 repeticiones. El bloque correspondió a la bandeja con las 14 placas Petri (Figura 5B). Para evaluar la eficacia en la penetración y progenie se disectó una larva muerta de *G. mellonella* por concentración y otra se puso a una trampa de White modificada, cuando el porcentaje de mortalidad superó al 20%, de lo contrario se disectaron todas las larvas muertas.

Análisis estadístico

En los tres ensayos la mortalidad de las larvas se corrigió mediante la fórmula de Abbott (1925).

$$\text{Mortalidad corregida (MC)} = \frac{(\% \text{ de mortalidad en el tratamiento} - \% \text{ mortalidad en el testigo})}{(100 - \% \text{ de mortalidad en el testigo})} \times 100$$

Para el análisis estadístico, los porcentajes de mortalidad obtenidos se transformaron por arcoseno $\sqrt{MC/100}$ y se sometieron a un análisis de varianza para determinar la eficacia de los tratamientos. Las medias de los tratamientos se separaron con el test de comparación múltiple de Tukey al 5% de significación.

Antes del análisis de varianza, los resultados de eficacia de penetración y progenie se sometieron a las pruebas de Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk) y de Levene, para evaluar la normalidad y homogeneidad de las varianzas, respectivamente, con el programa estadístico Minitab (versión 13). Los ensayos sobre el efecto de la temperatura y contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción se sometieron a un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, y el ensayo de determinación de la concentración letal a un análisis no paramétrico de Friedman por no cumplirse los requerimientos de un anova (Morales, 2005).

En el ensayo para la determinación de la concentración letal, la mortalidad a las 48 h se sometió a análisis Probit con el programa computacional Probit Program versión 1.5, que entrega la Concentración Letal media (CL50) y la CL90. Para determinar si existía cualquier asociación entre los parámetros se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las variables medidas.

Por último, se determinó la regresión lineal simple ($Y = a + b \cdot X$) entre las variable temperatura, contenido de agua y concentración v/s mortalidad corregida (MC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura sobre la infectividad y reproducción

Mortalidad del hospedero y tiempo de muerte

En este ensayo hubo mortalidad en las larvas expuestas al nemátodo, a diferencia del testigo en el que se mantuvieron vivas. En el primer día de evaluación se observó una disminución notoria de la movilidad de las larvas. Al segundo día la mayoría de ellas estaba inmóvil. Como síntoma característico de la infección por NE, las larvas muertas cambiaron de color debido a la bacteria simbiote, lo que indicó previamente su causa de muerte. Las larvas muertas por J3 se tornan marrón oscuro (Figura 6A), se vuelven flácidas, y no producen mal olor.



Figura 6. **A.** Larva de *G. mellonella* afectada por el NE *Steinernema* sp. **B.** Larva de coloración normal.

A 5°C no hubo mortalidad, pero la movilidad de la larva de *G. mellonella* en la evaluación fue muy baja. A 10°C hubo poca mortalidad y la movilidad de las larvas fue moderadamente baja. Además, a esta temperatura algunas larvas presentaron un color plomizo.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de mortalidad durante los 5 días de evaluación posteriores a la inoculación de juveniles infectivos del aislamiento del NE sobre larvas de *G. mellonella* para las diversas temperaturas. El porcentaje de mortalidad varió entre los tratamientos, con 97,5% y 90% en el segundo día después de la inoculación a 25 y 20°C respectivamente y 100% de mortalidad en el tercer día en ambas temperaturas. A 15°C se obtuvo 100% de mortalidad al tercer día de la inoculación de J3. A 30°C en el segundo día desde la inoculación sólo se obtuvo un 60% de mortalidad, y 100% al quinto día. En 10°C hubo una mortalidad de sólo 10% en el quinto día luego de la inoculación. A 5°C no hubo mortalidad.

El tiempo desde la inoculación hasta la muerte del hospedero ha sido reconocido como un aspecto importante en el ensayo, aunque la mortalidad máxima ocurrió generalmente durante el segundo día.

En el tiempo de muerte, sólo a los 2 días de la inoculación de J3 no hubo diferencias significativas entre las temperaturas de 20 y 25°C, y a 15°C se observó el tiempo más lento de muerte del hospedero, a los 3 días luego de la inoculación. A 30°C hubo mortalidad de larvas, aunque mínima (12,5%) desde el primer día, y alcanzó el 100% al quinto día. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mortalidad de larvas de *G. mellonella* durante los 5 días de evaluación posteriores a la inoculación de juveniles infectivos.

Tratamientos	Temperatura (°C)	Días posteriores a la inoculación de J3.				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
		Mortalidad (%) de larvas de <i>G. mellonella</i>				
T1	5	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
T2	10	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	10,0 a
T3	15	0,0 a	0,0 a	100,0 c	100,0 b	100,0 b
T4	20	0,0 a	97,5 c	100,0 c	100,0 b	100,0 b
T5	25	0,0 a	90,0 c	100,0 c	100,0 b	100,0 b
T6	30	2,5 b	60,0 b	90,0 b	95,0 b	100,0 b

Promedios dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) según Prueba de Tukey.

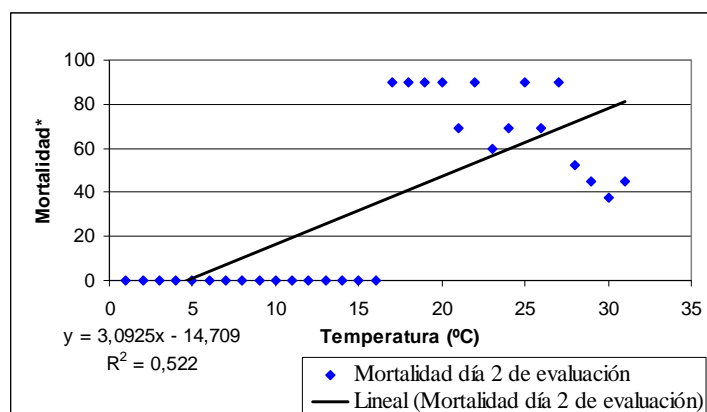


Figura 7. Regresión lineal entre las variables mortalidad y temperatura de incubación. * % de mortalidad.

Al hacer una regresión para determinar si existe una relación entre la temperatura y el porcentaje de mortalidad de las larvas en el segundo día después de la inoculación, los resultados obtenidos se ajustaron a una regresión lineal ($P = 0,000$; $r = 0,741$) (Figura 7).

Eficacia en penetración (número de nemátodos (J3) establecidos por larva)

En las disecciones de larvas de *G. mellonella* afectadas por NE, sus tejidos adquirieron una apariencia gomosa y se desintegraron totalmente (Figura 8A). Bajo lupa estereoscópica se determinó la presencia de *Steinernema* sp. en el interior de las larvas, demostrando su susceptibilidad a este aislamiento.

En las disecciones se observó además que *Steinernema* sp. logró continuar su ciclo de vida en las larvas muertas de *G. mellonella*. A 15, 20 y 25°C, la mayoría de las larvas contenían hembras del NE desarrolladas cargadas con huevos al segundo día luego de la muerte de la larva.

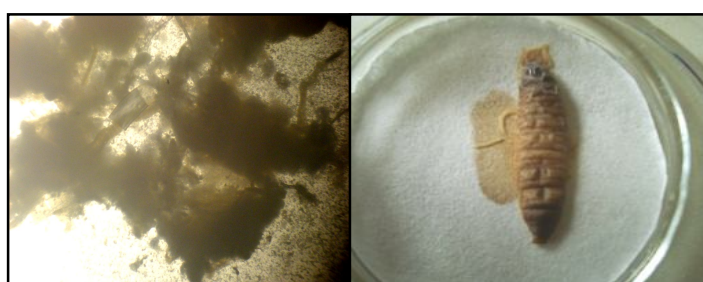


Figura 8. A. Apariencia gomosa y desintegración de los tejidos bajo disección de una larva *G. mellonella*. B. Migración de juveniles infectivos desde una larva de *G. mellonella*

La penetración de los juveniles infectivos fue considerablemente mayor para las temperaturas 15 y 20°C, y significativamente inferior a 30°C. En 25°C se apreció una penetración intermedia. No hubo penetración de juveniles infectivos a 5°C. A 10°C la penetración no fue considerada, ya que a esta temperatura se tuvo una baja mortalidad de larvas, sólo 10% en el quinto día después de la inoculación de juveniles infectivos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Penetración de J3, duración del ciclo de vida y emergencia de nuevos J3 del aislamiento del NE en los diversos tratamientos en una concentración de 100 J3/larva.

Trats.	Temperatura (°C)	Penetración (J3/larva)	Duración ciclo de vida (días)**	Emergencia (J3/larva)
T1	5	ND	ND	ND
T2	10	ND	ND	ND
T3	15	26,60 ± 11,39 c	17,25 ± 1,37 c	72884,85 ± 26417 b
T4	20	26,37 ± 11,19 c	10,55 ± 1,39 b	102807,3 ± 23256 c
T5	25	12,40 ± 7,23 b	9,05 ± 0,69 a	52107,80 ± 15452 a
T6	30	3,10 ± 2,55 a	ND	ND

Promedios dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Medias ± Desviación estándar (n=20). ND= no desarrollado.

** Ciclo de vida desde infección hasta emergencia de nuevos juveniles infectivos (J3).

Progenie

En la emergencia, se observaron masas blancas sobre la cutícula de la larva, es decir, la migración de los nuevos juveniles infectivos producidos a partir de los J3 que ingresaron con éxito al hospedante (Figura 8B).

El menor tiempo del ciclo de vida de NE (de infección hasta la emergencia de nuevos J3) ocurrió a 25°C con 9 días. A 20°C fueron 10 días y el ciclo más lento, a 15°C, tomó 17 días. No emergieron juveniles infectivos a los 5, 10 y 30°C (Cuadro 4).

El tiempo que demoraron los J3 desde la larva hasta el agua de la placa mayor de la trampa de White (Figura 4, flecha roja) varió entre los tratamientos, y el tiempo de recorrido fue mayor al bajar la temperatura, aproximadamente 3 días para 15°C y 2 días para 20 y 25°C.

En el Cuadro 4 se observa que significativamente más juveniles infectivos emergieron a 20°C, 102.807,3 J3/larva. Al quinto día posterior a la emergencia hubo una producción máxima de 37.023 J3, que disminuyó considerablemente hasta el término de la emergencia. El período desde el primer día de emergencia hasta su término fue aproximadamente un mes a esta temperatura. Este período disminuyó tanto al disminuir o aumentar de la temperatura óptima de reproducción y desarrollo (20°C).

A 25°C se observó el menor número total de juveniles infectivos. No se hubo emergencia a 5 y 10°C. En 30°C no hubo emergencia, y los J3 que pudieron penetrar a la larva no fueron capaces de desarrollarse y murieron a los pocos días de la penetración.

Los J3 de *Steinernema* sp. aislamiento Lican Ray entraron al insecto huésped por sus aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y liberaron su bacteria simbiótica. Éstas proliferaron en la hemolinfa y mataron al insecto dentro de las 48 h por septicemia en la mayoría de las larvas analizadas. Los nemátodos que penetran originan una primera generación de adultos de NE de sexos separados al tercer día luego de la infección (Figuras 9A y 9B), que se reproducen y dan a lugar a una segunda generación al sexto día (Figuras 9C y 9D). Cuando los recursos alimenticios comienzan a disminuir se produce el desarrollo de nuevos juveniles infectivos (Figura 9E), aproximadamente en 8 a 14 días a 25°C.²

² Flores, P. Ing. Agrónomo. Empresa Bioagro S.A. (Comunicación personal, 2011)

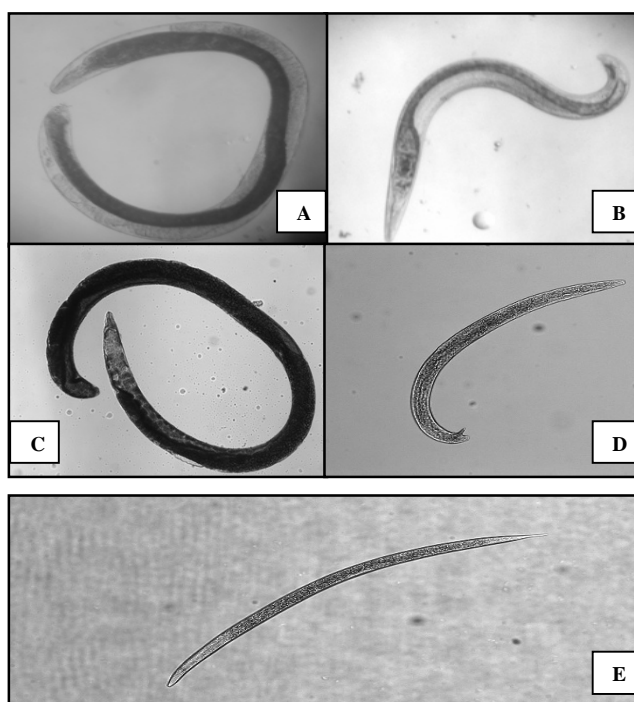


Figura 9. *Steinernema* sp. aislamiento “Lican Ray”. **A.** Hembra de primera generación. **B.** Macho de primera generación. **C.** Hembra de segunda generación. **D.** Macho de segunda generación. **E.** Juvenil infectivo (J3).

A 25°C, el aislamiento del NE presentó la mayor tasa de mortalidad. A 20°C la tasa de mortalidad tendió a disminuir, pero no significativamente. Sin embargo, a 20°C se tuvo el mayor número de juveniles infectivos emergidos de este nemátodo. Por lo tanto, 20°C se estimó como la temperatura óptima de reproducción y desarrollo de este aislamiento, por lo que se la utilizó para los otros ensayos.

Determinación de la Concentración Letal

Mortalidad del hospedero y tiempo de muerte

Al igual que en el ensayo anterior, la infección por NE, presentó los mismos síntomas descritos anteriormente (Figura 6).

Los resultados de mortalidad de larvas de *G. mellonella* por los NE durante los 4 días de evaluación posteriores a la inoculación de J3 se presentan en el Cuadro 5. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos en los dos primeros días de evaluación. La mortalidad fue afectada por la concentración de los nemátodos, y al aumentar la dosis de 10

a 80 J3/larva la mortalidad creció del 70 al 100 %. Al tercer día luego de la inoculación se alcanzó 100% de mortalidad larvaria en todos los tratamientos.

Aunque la mortalidad máxima ocurrió generalmente dentro del segundo día, el número de días para la muerte del hospedero aumentó al disminuir la concentración de J3.

Cuadro 5. Mortalidad de larvas de *G. mellonella* durante los 4 días de evaluación posteriores a la inoculación de juveniles infectivos a 20°C.

Tratamientos	Concentración (J3/larva)	Días posteriores a la inoculación de J3							
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4				
T1	10	0	abcd	70	a	100	a	100	a
T2	20	0	abcde	70	ab	100	a	100	a
T3	40	0	abc	80	ab	100	a	100	a
T4	80	0	ab	100	b	100	a	100	a
T5	120	0	a	100	b	100	a	100	a
T6	240	20	f	100	b	100	a	100	a

Promedios dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) según Prueba de Tukey.

La concentración letal media (CL50) y CL90 para el aislamiento Lican Ray al segundo día luego de la inoculación de J3 fue 7,174 y 40,416 J3/larva, respectivamente.

Al hacer una regresión para determinar si existe alguna relación entre la concentración (J3/12 μ L de agua destilada) y el porcentaje de mortalidad al segundo día después de la inoculación, los resultados no se ajustaron a una regresión lineal ($P=0,020$; $r=0,422$) (Figura 10).

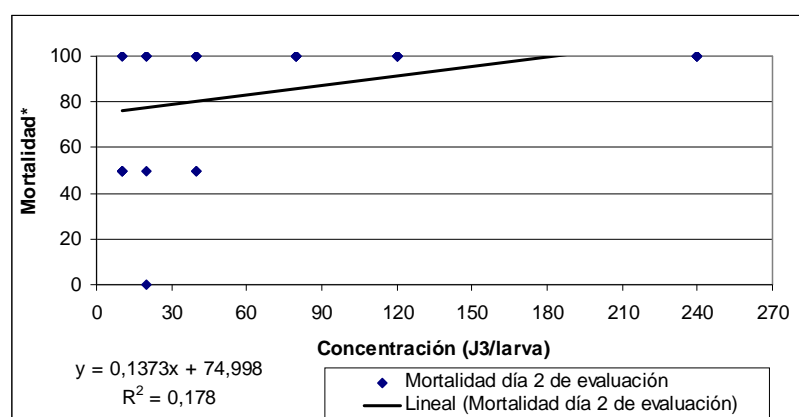


Figura 10. Regresión lineal entre las variables mortalidad y concentración de nemátodos inoculados por larva. * % de mortalidad.

Eficacia en penetración (número de nemátodos (J3) establecidos por larva)

El número de nemátodos que penetraron en el hospedero aumentó a medida que la concentración de J3 inoculados fue mayor (Cuadro 6). En la EP no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La concentración de nemátodos no afectó significativamente la EP. Sin embargo, la EP promedio por concentración fue variable, con un rango de $24\% \pm 16,73$ en una concentración de 10 NE y $49,6\% \pm 19,59$ en una de 240 NE (Cuadro 6).

Cuadro 6. Penetración, eficacia de penetración (EP) duración del ciclo de vida y emergencia de nuevos J3 del aislamiento del NE a 20°C.

Trat.	Penetración	Eficacia de penetración (EP)	Duración ciclo de vida*	Emergencia
	(J3/larva)	(J3/larva)	(días)	(J3/larva)
T1	$2,4 \pm 1,67$ a	$24 \pm 16,73$ a	$13,5 \pm 5,69$ a	$64919,25 \pm 41294,79$ ab
T2	$6,6 \pm 1,82$ b	$33 \pm 9,08$ a	$12 \pm 1,73$ a	$79130,2 \pm 16801,69$ a
T3	$10 \pm 5,24$ bc	$25 \pm 13,25$ a	$11,2 \pm 0,45$ a	$95787,8 \pm 18570,08$ abc
T4	$20,8 \pm 3,9$ d	$26,4 \pm 4,77$ a	$11,4 \pm 0,55$ a	$90316,2 \pm 8542,41$ abc
T5	$40,8 \pm 17,3$ de	$34 \pm 14,26$ a	$11 \pm 0,71$ a	$106152 \pm 13569,29$ c
T6	$118,8 \pm 46,77$ f	$49,6 \pm 19,59$ a	$11,2 \pm 1,48$ a	86240 ± 67172 abc

Promedio dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Medias \pm Desviación estándar ($n=5$). * Ciclo de vida desde infección hasta la emergencia de nuevos juveniles infectivos.

Progenie

En el Cuadro 6 se presenta el tiempo que demora el ciclo de vida desde la infección hasta la emergencia de nuevos juveniles infectivos. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos, aunque este ciclo tendió a ser mayor a disminuir la concentración.

El número de J3 emergidos por larva, fue significativamente mayor en el tratamiento 5, 120 J3/larva (Cuadro 6).

A medida que aumentó la concentración el porcentaje de mortalidad tendió a aumentar, a pesar que el número de J3 que pudieron penetrar en la larva no presentó diferencias significativas entre tratamientos. A la concentración de 120 J3/larva se tuvo la mayor emergencia numérica de nuevos juveniles infectivos. Por ello, esta concentración se consideró como la apropiada para ser utilizada en el ensayo sobre el efecto del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción.

Efecto del contenido de agua en el sustrato sobre la infectividad y reproducción

Mortalidad del hospedero y tiempo de muerte

Al igual que en los ensayos anteriores, los síntomas de infección de NE en la mayoría de las larvas, fueron los mismos que aquellos descritos anteriormente (Figura 6).

Cuadro 7. Mortalidad de larvas de *G. mellonella* durante los 5 días de evaluación posteriores a la inoculación de 120 juveniles infectivos/larva a 20°C.

Tratamientos	Contenido de agua	Días posteriores a la inoculación de J3				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Mortalidad (%) de larvas de <i>G. mellonella</i>						
T1	P.M.P ¹	0,0 a	73 a	93 a	98 a	100 a
T2	C.C ²	2,5 a	93 b	100 b	100 a	100 a
T3	Saturación	2,5 a	100 b	100 b	100 a	100 a

Promedios dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) según Prueba de Tukey.

¹Contenido de agua en punto de marchitez permanente, ²en capacidad de campo.

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por acción de los NE durante los 5 días de evaluación posteriores a la inoculación.

Las pruebas para medir la mortalidad realizados con el sustrato sobre larvas de último estadio de *G. mellonella*, tuvieron porcentajes de mortalidad del 73% al segundo día luego de la inoculación de J3 en el Punto de Marchitez Permanente, 93% en Capacidad de Campo y 100% en Saturación. En todos los tratamientos, el 100% de mortalidad se produjo en el quinto día posterior a la inoculación de J3 (Cuadro 7).

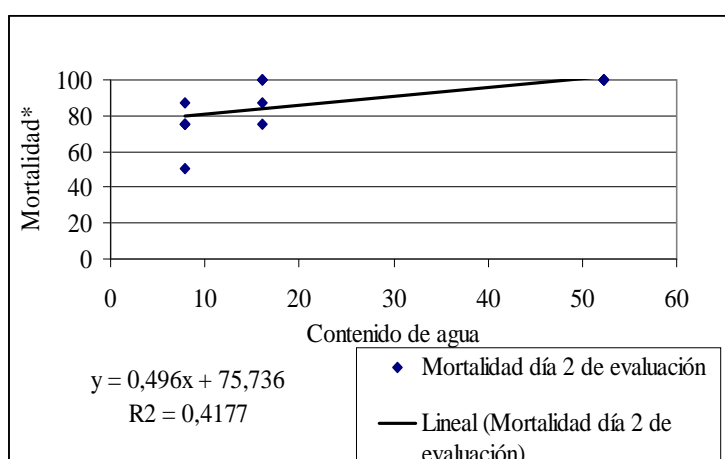


Figura 11. Regresión lineal Diagrama de dispersión entre las variables mortalidad y retención de agua (%bss). * % de mortalidad.

Al hacer una regresión para determinar si existe una relación entre el contenido de agua del sustrato y el porcentaje de mortalidad al segundo día después de la inoculación, los resultados obtenidos no se ajustaron a un modelo de regresión lineal a un nivel de significación de 0,05 ($P=0,009$; $r=0,646$) (Figura 11).

En el tiempo de muerte del hospedero desde la inoculación del NE, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero este tiempo tendió a aumentar en el Punto de Marchitez Permanente.

Eficacia en penetración (número de nemátodos (J3) establecidos por larva)

La eficacia de penetración no presentó diferencias significativas entre tratamientos, aunque la penetración de J3 disminuyó numéricamente en el PMP, y los otros dos tratamientos presentaron una penetración similar (Cuadro 8).

Progenie

El tiempo que demora la infección hasta la emergencia de nuevos juveniles infectivos (J3) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque aumentó numéricamente a la Capacidad de Campo, en los otros dos tratamientos el ciclo de vida se demoró 10,1 días (Cuadro 8).

Cuadro 8. Penetración, eficacia de penetración (EP), duración ciclo de vida y emergencia de nuevos J3 del aislamiento de nemátodo entomopatógeno por tratamiento a 20°C con 120 J3/mL^{**}.

Trats.	Penetración (J3/larva)	Eficacia de penetración (EP) (J3/larva)	Duración ciclo de vida (días)*	Emergencia (J3/larva)
T1	24,90 ± 11,49 a	20,80 ± 11,49 a	10,10 ± 1,55 a	75180,10 ± 37210,46 a
T2	36,84 ± 21,37 a	30,84 ± 21,37 a	10,53 ± 0,74 b	81518,33 ± 24150,10 a
T3	38,40 ± 18,20 a	38,40 ± 18,20 a	10,10 ± 0,16 ab	70975,50 ± 23629,54 a

*Ciclo de vida desde infección hasta emergencia de nuevos juveniles infectivos (J3).

**Concentración elegida de acuerdo a los resultados del Ensayo; “Determinación de la concentración letal”. Promedios dentro de la columna seguida con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Media ± Desviación Estándar (n=20).

En el número de J3 emergidos por larva, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero con un aumento numérico en el tratamiento 2, a la Capacidad de Campo (Cuadro 8).

Discusión

En base a la información climática, se esperaba que *Steinernema* sp. fuera una especie adaptada al frío. Sin embargo, a pesar que *Steinernema* sp se adapta bien a temperaturas moderadamente frías y cálidas, y tiene un rango de infectividad entre 10 y 30°C (óptimo de 15 a 25°C) y un rango de reproducción entre 15 y 25°C (óptimo 20 a 25 °C), los resultados de infectividad y reproducción a varias temperaturas en nuestro estudio demostraron que este aislamiento no infecta a larvas de *G. mellonella* bajo 10°C.

Los rangos de temperatura para la supervivencia, infección y desarrollo de NE varían con la especie y aislamiento (Fernández *et al.*, s.a; Saunders y Webster, 1999). Por ejemplo, Koppenhöfer *et al.* (2000) reportaron que *S. monticolum* Stock, Choo & Kaya infectaron larvas de *G. mellonella* entre 8 y 30°C (óptima 12 a 25 C) y produjeron progenie entre 12 y 25°C (óptima 15 a 25°C). *S. rarum* (de Doucet) alcanzó el 100% de infectividad de larvas de *G. mellonella* entre 15 y 33°C, y la reproducción se produjo entre 15 y 30°C (Koppenhöfer y Kaya, 1999). Esos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Steinernema feltiae (Filipjev) es una especie muy común en muchas partes del mundo, y es conocida como una especie adaptada al frío que puede infectar a su huésped desde 8 a 28°C y producir juveniles infectivos desde 8 a 25°C (Hazir *et al.*, 2001; Grewal *et al.*, 1994, 1996; Wright, 1992). Por otro lado, *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, y *S. glaseri* (Steiner) son especies adaptadas al calor, y la infectividad de su hospedero ocurre entre 10 y 39°C y 10 y 37°C, respectivamente. *S. riobrave* se reproduce entre 20 y 35°C, y *S. glaseri* de 12 a 32°C (Grewal *et al.*, 1994). Las temperaturas más bajas para la reproducción de los nemátodos son 8°C para *S. feltiae* (Hazir *et al.*, 2001) y 10°C para *S. affine* (Bovien), mientras que la temperatura más baja es 15°C para *S. anatoliense* Hazir, Stock & Keskin (Gungor *et al.*, 2006), al igual que para la especie de *Steinernema* analizada en este estudio.

Algunas especies de *Steinernema*, como *S. feltiae* (Hazir *et al.*, 2001) y *S. monticolum* Stock, Choo & Kaya (Koppenhöfer *et al.*, 2000), como también la especie de *Steinernema* analizada en este trabajo, no se reproducen a 30 °C, pero *S. anatoliense* Hazir, Stock & Keskin, en forma similar a los otros steinermátidos adaptados al calor, produce emergencia a esta temperatura (Gungor *et al.*, 2006).

Fernández *et al.* (s.a.) consideraron que la infectividad ocurre a un rango de temperatura mayor que la reproducción y desarrollo, y que la infección puede ocurrir a bajas temperaturas sin un subsecuente desarrollo e igualmente a estas temperaturas los NE pueden ser menos activos y requerir un mayor tiempo para encontrar al hospedante, de manera similar a lo ocurrido en nuestro estudio, ya que en temperaturas bajas (5°C) no hubo mortalidad o ésta fue muy baja, y sólo alcanzó 10% a 10°C al quinto día luego de la inoculación de J3. Además consideraron que la temperatura puede afectar al hospedante, haciéndolo más o menos vulnerable a los nemátodos.

Sáenz (2003), estableció que la alta mortalidad registrada en el hospedante es independiente al número de juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* (Filipjev). Sin embargo, Fan *et al.* (2000) estimaron que la mortalidad aumenta con la dosis, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio.

Cabe destacar que la eficacia de penetración de los nemátodos en un hospedero es muy sensible a las condiciones del ensayo, probablemente más que la mortalidad del hospedero (Epsky y Capinera, 1993).

De acuerdo a nuestros resultados, el número de nemátodos que entraron en el hospedero aumentó con la concentración de J3 inoculados. Sin embargo, la eficacia de penetración, tendió a ser similar, lo que fue observado también por Fan *et al.* (2000) con *S. feltiae* (Filipjev). En su estudio, las larvas de *G. mellonella* L. fueron altamente susceptibles a la infección por juveniles infectivos, los que produjeron 100% de mortalidad al inocular tanto 53 como 114 J3/larva.

La capacidad para penetrar de los nemátodos del aislamiento Lican Ray fue variable, de 20 a 50% de los nemátodos aplicados logró infectar al hospedero. Esto puede indicar que hay algunos factores limitantes en el hospedero o en el NE, o que depende de la capacidad de los NE para invadir al hospedero. Puede ser que el hospedero tolere un número máximo de nemátodos o que existan límites en la cantidad de nemátodos que se pueden establecer dentro del hospedero (Epsky y Capinera, 1993; Fan *et al.*, 2000). Según Lewis *et al.* (2006), el número de juveniles infectivos debe ser suficiente para superar las defensas del hospedero, y por encima de este número mínimo necesario, cada nemátodo adicional es un competidor potencial. Sin embargo, en ensayos de laboratorio, los steinernemátidos continúan invadiendo al hospedero hasta llegar a un hacinamiento en exceso de capacidad de carga del hospedero, disminuyendo la reproducción que emerge por nemátodo invasor, lo que se observó en nuestro estudio al aplicar 240 J3/larva. Además establecieron que en densidades muy altas no se produjeron J3 en el cadáver

Es interesante destacar que al aplicar una dosis de 40,416 J3/larva no hubo mayores incrementos de la mortalidad al segundo día después de la inoculación, y que ésta se mantuvo igual o con un ligero incremento, lo cual demuestra que al pasar de cierto umbral, el incremento de la concentración, no causa mayor mortalidad.

Por otra parte, en una investigación de Koppenhöfer y Kaya (1995) el aumento de la densidad de J3 de *S. glaseri* (Steiner) en el suelo afectó la eficiencia de penetración y reproducción de los nemátodos en larvas de *G. mellonella*. La mayor producción de J3 nuevos ocurrió entre $20,7 \pm 3,3$ y $58,0 \pm 6,6$ J3 por hospedero, y no hubo progenie desde los cadáveres cuando la densidad superó los $184,4 \pm 37,7$ J3 establecidos por hospedero.

La humedad del suelo es otro factor importante para la supervivencia e infectividad de los NE. Éstos necesitan una película de agua a su alrededor para el movimiento y la infectividad (Grant y Villani, 2003; Koppenhöfer y Fuzy, 2007; Morton, 2009;). El contenido de agua del suelo puede tener diversos efectos sobre las especies de NE, debido a

diferencias en las adaptaciones fisiológicas y de comportamiento. La infectividad de los nemátodos tiende a ser óptima en niveles moderados de contenido de agua del suelo y se vuelven menos eficaces en un suelo saturado o seco. Sin embargo, los rangos de actividad óptima varían entre las especies (Gungor *et al*, 2006; Koppenhöfer y Fuzy. 2007)

En este estudio, el aislamiento Lican Ray presentó una infectividad y reproducción óptima cuando el contenido de agua del sustrato fue cercano a la Capacidad de Campo, en forma similar a los resultados obtenidos por Koppenhöfer y Fuzy (2007), quienes expusieron larvas de *Popillia japonica* Newman a *S. scarabaei* (Stock & Koppenhöfer) en un suelo franco arenoso y otro franco limoso. El nemátodo presentó infectividad mayor en un contenido de agua de suelo moderada (de -10 a -100 kPa), y tendió a ser menor en un suelo con un contenido de agua alta (-1 kPa) y en un suelo moderadamente seco (-1000 kPa). Susurluk *et al.* (2001) encontraron que el contenido ideal de agua en el suelo para que *S. feltiae* invada a su hospedero era 10%, pero cuando el contenido de agua fue 20%, el número de J3 invasores disminuyó drásticamente. En el estudio de Gungor, *et al.* (2006), más J3 de *S. anatoliense* Hazir, Stock & Keskin invadieron larvas de *G. mellonella* L. con 10% de agua, el número de J3 establecidos disminuyó por encima y por debajo de 10%, y no se observó infectividad al 20%.

CONCLUSIONES

- El parasitismo, progenie y eficacia de penetración del aislamiento Lican Ray se vieron afectados por factores abióticos como la temperatura y el contenido de agua del sustrato.
- Una larva de último estadio de *G. mellonella* con un peso promedio de 200 mg pudo producir 102.807 J3 en promedio a la temperatura óptima de reproducción (20°C).
- El número de nemátodos que entraron en el hospedero aumentó con la concentración de J3 inoculado, sin embargo, la eficacia de penetración tendió a ser similar, no se vio afectada al aumentar la concentración.
- Al aplicar concentraciones superiores a 40,416 J3/larva no hubo un incremento significativo en la mortalidad, lo que demuestra que al pasar de cierto umbral, el incremento de la concentración de J3 no garantiza una mayor mortalidad.
- El aislamiento Lican Ray presentó una infectividad y reproducción óptimas cuando el contenido de agua del sustrato fue cercano a la capacidad de campo.
- Es importante desarrollar estudios relacionados con los factores que limitan la susceptibilidad del hospedante e invasión de los nemátodos, para que los NE sean usados con éxito en situaciones diversas contra un amplio rango de insectos plaga.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, W. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18(2): 265-267.
- ADAMS, A and K. NGUYEN. 2002.** Taxonomy and systematics. pp. 1-33. *In:* Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 388 p.
- BEDDING, R., A. MOLYNEUX, and R. AKHURST. 1983.** *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: Interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Experimental Parasitology* 55 (2): 249–257.
- BROWN, M. and R. GAUGLER. 1997.** Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematode. *Nematologica* 43(5): 363-375.
- CASTILLO, J., O. BUENDIA , J. ALCAZAR y T. ROSALES. 2009.** Aislamiento y patogenicidad del nemátodo *Heterorhabditis* spp en suelo de espárrago en la irrigación de Chavimochic. Disponible en: <http://www.ias2009peru.com/presentations/021%20Jorge%20Castillo%20-%20Aislamiento%20y%20Patogenicidad%20del%20Nematodo%20Heterorhabditis%20sp%20en%20Suelo%20de%20Esp.pdf> . Leído el 09 de marzo de 2012.
- DIVYA, K and M. SANKAR. 2009.** Entomopathogenic nematodes in pest management. *J. Sci. & Technol.* 2(7): 53-60. Disponible en: <http://indjst.org/archive/vol.2.issue.7-8/jul09divya.pdf>. Leído el 01 de noviembre de 2010.
- EDGINGTON, S., A. BUDDIE, D. MOORE, A. FRANCE, L. MERINO, L. TYMO, and D. HUNT. 2010.** Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology* 12(6): 915-928.
- EPSKY, N. and J. CAPINERA. 1993.** Quantification of invasion of two strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into three lepidoptera larvae. *Journal of Nematology*. 25(2): 173-180.
- FAN, X. and W. HOMINICK. 1991.** Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from sand and soil. *Revue de Nématologie* 14(3): 381-387.
- FAN, X., A. MAGGIORANI y S.GUDIÑO. 2000.** Uso de nemátodos entomopatógenos como una alternativa de control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Forestal Venezolana* 44(1): 115-118.

FERNÁNDEZ, E., E. ARTEAGA y M. PÉREZ. s.a. Utilización de los nemátodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas. Laboratorio de Nematología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Habana, Cuba. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm>. Leído el 22 de agosto de 2011.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria). 2011. Resultados y lecciones en biocontrol del cabrito de los frutales con nemátodos entomopatógenos. Proyecto de innovación en Regiones del Biobío, de la Araucanía y de los Lagos. Serie Experiencias para el Emprendimiento Agrario. 27 p.

FORST, S. and D. CLARKE. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. pp. 57-77. *In:* Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK. 388 p.

GARCÍA DEL PINO, F. 1994. Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Memoria Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias. Barcelona, España.

GONZÁLEZ, E. 1998. Efecto de la concentración de nemátodos entomopatógenos sobre la mortalidad de *Anastrepha ludens*. Tesis Maestría en Biología, especialidad en Microbiología. Universidad de Colima. Colima, México. 148 p.

GRANT, J. and M.G. VILLANI. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology*. 32(1):80-87.

GREWAL P., R. GAUGLER and Y. WANG. 1996. Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. *Annals of Applied Biology* 129(2): 335–341.

GREWAL, P., S. SELVAN AND R. GAUGLER. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology* 19(4): 245–253.

GRIFFIN, C., N. BOEMARE, and E. LEWIS. 2005. Biology and behaviour. pp: 47-59 *In:* P. Grewal, R.U. Ehlers, and D. Shapiro-Ilan (Eds.). Nematode as biocontrol agents. CABI. Publishing. Wallingford, U.K. Disponible en: <http://eprints.nuim.ie/735/1/BIOL-CG.pdf>. Leído el 23 de agosto de 2010.

GUNGOR, D., N. KESKIN, and S. HAZIR. 2006. Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 92: 39-44.

HAZIR, S., H. KAYA, P. STOCK, and N. KESKIN. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*. 27: 181-202.

HAZIR, S., P. STOCK, H. KAYA, A. KOPPENHÖFER, and N. KESKIN. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 77: 243-250.

KAYA, H. 1993. Entomogenic and entomopatogenic nematodes in biological control. pp. 575-591. *In: Evans, K., D. Trudgill, and J. Webster (ed.), Plant parasitic nematodes in temperate agriculture.* CAB International. 648 p.

KAYA, H. and P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. pp. 281- 324 *In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of techniques in insect pathology.* Academic Press, San Diego, CA.

KAYA, H. and R. GAUGLER. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38: 181-206.

KOPPENHÖFER, A and E. FUZY. 2008. Long-term Effects and Persistence of Nematodes for Suppression of White Grubs. *USGA Turfgrass and Environmental Research Online* 7(21):1-14.

KOPPENHÖFER, A. and E. FUZY. 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*, a scarab-adapted entomopathogenic nematode from New Jersey. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83: 139-148.

KOPPENHÖFER, A. and E. FUZY. 2007. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology* 35: 128-139.

KOPPENHÖFER, A. and H. KAYA. 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 120-128.

KOPPENHÖFER, A. and H. KAYA. 1995. Density-dependent effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an insect host. *The Journal of Parasitology*. 81(5): 797-799.

KOPPENHÖFER, A., S. GANGULY, and H. KAYA. 2000. Ecological characterization of *Steinernema monticolum*, a cold-adapted entomopathogenic nematode from Korea. *Nematology* 2(4): 407-416.

LEWIS, E., J. CAMPBELL, C. GRIFFIN, H. KAYA, and A. PETERS. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38(1): 66-79.

- LOZANO, J. 2001.** El estrés calórico en la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 en nemátodos entomopatógenos (Rhaditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Tesis Doctorado en Ciencias, Área Biotecnología. Universidad de Colima. Colima, México. 122p.
- MAGUNACELAYA, J. y E. DAGNINO. 1999.** Nematología agrícola en Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. Santiago, Chile. 282 p.
- MERINO, L. y A. FRANCE. 2009.** Nematodos entomopatógenos: Control biológico de insectos de importancia económica. *Tierra Adentro* mayo-junio: 24-25.
- MERINO, L., A. FRANCE, S. EDGINGTON y M. GERDING. 2009.** Prospección, colecta e identificación nemátodos entomopatógenos nativos de Chile. VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. *INIA* 331(2): 191-192.
- MORALES, E. 2005.** Diseño experimental a través del análisis de varianza y modelo de regresión lineal. Consultora Carolina. Valdivia. Chile. 245p.
- MORTON, A. 2009.** Los nematodos entomopatógenos (Rhaditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Tesis Doctorado Zoología. Departamento Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Barcelona, España. 179 p.
- NGUYEN, K. and G. SMART. 1992.** Life cycle of *Steinernema scapterisci* Nguyen & Smart, 1990. *Journal of Nematology*. 24(1): 160-169.
- RIOBO, M. 1991.** Prospección de nematodos del suelo asociados a larvas de burrito de la vid *Naupactus xanthographus* (Germar). Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile. 54 p.
- SÁENZ, A. 2003.** Eficacia de invasión de *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus* por el nematodo *Steinernema feltiae*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. Costa Rica. 67: 35-43.
- SÁENZ, A. y J. LUQUE. 2000.** Ciclo de vida del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* Filipjev. *Agronomía Colombiana* 17: 17-24.
- SÁENZ, A. y W. OLIVARES. 2008.** Capacidad de búsqueda del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhaditida: Steinernematidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 34(1): 51-56.
- SAUNDERS, J. and J. WEBSTER. 1999.** Temperature effects on *Heterorhabditis megidis* and *Steinernema carpocapsae* infectivity to *Galleria mellonella*. *Journal of Nematology*. 31(3): 299-304.

SHAPIRO-ILAN, D., R.GAUGLER, L. TEDDERS, I. BROWN, and E. LEWIS. 2002. Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 34 (4): 343-350.

SMART, G. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. *Journal of Nematology*. 27(4S): 529-534.

STOCK, P., L. URIBE, L. URIBE, y L. FLORES. 2008. Apuntes curso. Aplicación Biotecnológicas de los Nemátodos Parásitos de Insectos. Universidad de Costa Rica. 87 p.

STRONG , D., H. KAYA, A. WHIPPLE, A. CHILD, S. KRAIG, M. BONDONNO, K. DYER and J. MARON. 1996. Entomopathogenic nematodes: natural enemies of root-feeding caterpillars on bush lupine. *Community Ecology* 108(1): 167-173.

SUSURLUK, A., I. DIX, E. STACKEBRANDT, O. STRAUCH, U. WYSS, and R. EHLERS. 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. *Nematology* 3(8): 833-841.

WOODRING, L.J. and K.H. KAYA. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A Handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. A publication of the Nematode Subcommittee of the Southern Research Project S135-Entomopathogens for use in Pest Management Systems. Arkansas Agric. Exp. Stn., Fayetteville, Arkansas.

WRIGHT P. 1992. Cool temperature reproduction of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 60 (2): 148–151.