

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**Memoria de Título**

**EFFECTO DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN EL SUELO Y SU  
GRADO DE DESCOMPOSICIÓN SOBRE EL DESPLAZAMIENTO DE  
*STEINERNEMA* SP. AISLAMIENTO LICÁN RAY BAJO CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

**GERALDINE SIPORA ALLENDE JURI**

**Santiago, Chile**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**EFFECTO DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN EL SUELO Y SU  
GRADO DE DESCOMPOSICIÓN SOBRE EL DESPLAZAMIENTO DE  
*STEINERNEMA* SP. AISLAMIENTO LICÁN RAY BAJO CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

**EFFECT OF THE ORGANIC MATTER CONTENT IN SOIL AND THEIR  
DECOMPOSITION DEGREE ON *STEINERNEMA* SP. STRAIN LICÁN RAY  
DISPLACEMENT ON LABORATORY CONDITIONS**

**GERALDINE SIPORA ALLENDE JURI**

**Santiago, Chile**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**EFFECTO DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN EL SUELO Y SU  
GRADO DE DESCOMPOSICIÓN SOBRE EL DESPLAZAMIENTO DE  
STEINERNEMA SP. AISLAMIENTO LICÁN RAY BAJO CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

Memoria para optar al Título Profesional de:  
Ingeniera Agrónoma

**GERALDINE SIPORA ALLENDE JURI**

**PROFESORES GUÍA**

Sr. Erwin Aballay E.  
Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.

Srta. Gabriela Lankin V.  
Ingeniera Agrónoma, M.S. Ph. D.

**PROFESORES EVALUADORES**

Sr. Oscar Seguel S.  
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Sra Paola Silva C.  
Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. Dr.

**Santiago, Chile**

**2015**

## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| RESUMEN.....  | 1             |
| ABSTRACT.....   | 2             |
| INTRODUCCIÓN.....   | 3             |
| Hipótesis.....  | 7             |
| Objetivo general.....   | 7             |
| Objetivos específicos.....  | 7             |
| MATERIALES MÉTODOS.....   | 8             |
| Lugar de estudio.....   | 8             |
| Crianza del nemátodo entomopatógeno.....  | 8             |
| Crianza del hospedero.....  | 9             |
| Suelo y Materia orgánica.....   | 10            |
| Arena experimental.....   | 12            |
| Tratamientos.....   | 14            |
| Diseño experimental.....  | 15            |
| Evaluación.....   | 15            |
| Análisis estadístico.....   | 15            |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 16            |
| Mortalidad de larvas de <i>G. mellonella</i> a las 48 y 96 h de medición.....   | 16            |
| Interacción entre dosis de M.O. (%) y su grado de descomposición.....   | 18            |
| Mortalidad de larvas de <i>G. mellonella</i> en suelos de textura franca con distintas dosis de materia orgánica, inoculados con el NEP <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray..... | 18            |

|  |    |
|--|----|
| Mortalidad de larvas <i>G. mellonella</i> en suelos de textura franca en mezcla con materia orgánica en distintos estados de descomposición, inoculados con el NEP <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray..... | 20 |
| Comparación de la mortalidad de larvas <i>G. mellonella</i> entre todos los tratamientos inoculados con el NEP <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray.....   | 22 |
| CONCLUSIONES.....  | 24 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 25 |

## RESUMEN

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) son controladores naturales de una amplia gama de insectos que habitan en el suelo, hábitat natural de los NEP. Esto ha hecho considerarlos una alternativa efectiva para controlar plagas de suelo y en los últimos años, numerosos estudios han evaluado la capacidad infectiva de los NEP bajo distintas condiciones. En este estudio se evaluó el efecto de la materia orgánica en el suelo, sobre el desplazamiento del nemátodo nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, evaluando su infectividad sobre larvas de la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella* (L.), en condiciones de laboratorio. Para ello, se mezcló suelo de textura franca y materia orgánica en dosis de 0, 2, 4 y 6%, en estados de descomposición inicial, intermedio y avanzado, definidos por tamaño de partícula y análisis químico, además de un tratamiento con suelo calcinado, eliminando toda la materia orgánica de éste. Todos los tratamientos fueron expuestos a altas temperaturas para disminuir la carga microbiológica y posteriormente congelados. Cada mezcla fue puesta en arenas experimentales, las cuales fueron inoculadas con una solución de  $1 \times 10^6$  NEP  $m^{-2}$  a 20 cm de una placa Petri con 5 larvas de último estadio de *G. mellonella*. La mortalidad de larvas se evaluó cada 48 horas. El análisis estadístico mostró que los factores “dosis de materia orgánica” y “estado de descomposición” no interactuaron, por lo que los resultados fueron analizados por separado. A partir de las 48 horas, se observaron síntomas de infección en las larvas, ocurriendo reducción de la movilidad, cambio de color y flacidez. En todos los tratamientos, a las 96 horas se obtuvo la mayor mortalidad en promedio, superando el 80%, y siendo 100% en los tratamientos con dosis de materia orgánica de 2 y 4% en estado avanzado de descomposición. Es decir, los nemátodos se desplazaron a través del suelo hasta encontrar a su presa. Evaluando por separado los factores, se observó un 80% de mortalidad en promedio para el factor “dosis de materia orgánica” y 90% de mortalidad en promedio para el factor “estado de descomposición de la materia orgánica”. En el tratamiento con suelo calcinado no ocurrió mortalidad de larvas en ninguna de las repeticiones. De esta forma, se infiere que la materia orgánica ejerce cambios en las propiedades del suelo que resultan favorables para el movimiento y sobrevivencia de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray bajo condiciones controladas de laboratorio.

**Palabras clave:** control biológico, nemátodos entomopatógenos, plagas de suelo, materia orgánica, propiedades físicas de suelo.

## ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPN) are natural controllers of a wide range of soil-inhabiting insects, their natural habitat. This has brought to consider them an effective biocontrol agent and during recent years, numerous studies have successfully evaluated the infective capacity of EPN under different conditions. The effect of soil organic matter on the displaceability of the native nematode *Steinernema* sp. strain Licán Ray, was evaluated through its infective capacity on the wax moth larvae, *Galleria mellonella* (L.), under laboratory conditions. For this purpose, organic matter was added to loam textured soil in doses of 0, 2, 4 and 6% in initial, intermediate and advanced state of decomposition, defined by size particle and chemical analysis. Also, a treatment of calcined soil was included, in which all existing organic matter was eliminated. All treatments were treated with heat, in order to eliminate microorganisms, and then frozen. Each treatment was put in experimental arenas, which was inoculated with a  $1 \times 10^6$  EPN  $m^{-2}$  solution within a distance of 20 cm of a Petri dish containing 5 larvae of *G. mellonella* in their last instar. Then, larval mortality was assessed every 48 hours. The statistical analysis showed that the factors “organic matter doses” and “decomposition state” did not interact; therefore the results were analyzed separately. Symptoms of infection in the larvae, less mobility, change of color and flaccidity, were observed at 48 hours. In average, greater mortality was observed in all the treatments after 96 hours, reaching values above 80% and 100% in the treatments with advanced decomposition state and doses of organic matter of 2 and 4%, showing that nematodes moved through the soil to find its prey. When each factor was evaluated separately, an average mortality of 80 and 90% for the “organic matter dose” and “decomposition state of the organic matter”, respectively, was recorded. In the treatment of calcined soil no larvae mortality occurred in none of the repetitions. These results suggest that the presence of organic matter modify physical soil properties, and this has a favorable impact on the mobility and survival of *Steinernema* sp. strain Licán Ray under controlled laboratory conditions.

**Key words:** biological control, entomopathogenic nematodes, soil pests, soil organic matter, physical soil properties.

## INTRODUCCIÓN

El control biológico consiste en la utilización de organismos vivos o enemigos naturales para reducir, de forma temporal o permanente, las poblaciones de plagas a densidades menores a un umbral de daño económico (Van Driesche *et al.*, 2007).

Entre los enemigos naturales de insectos, los nemátodos entomopatógenos (NEP) han cobrado gran importancia en las últimas décadas, debido a que su comportamiento alimenticio les otorga una ventaja como agentes de control biológico, ya que poseen un amplio rango de insectos hospederos (Merino y France, 2009), alta virulencia y se pueden multiplicar artificialmente, por lo que pueden ser producidos comercialmente. Además son compatibles con variados plaguicidas químicos y biológicos, pueden persistir en el ambiente sin contaminarlo, no afectan plantas ni vertebrados y pueden ser utilizados en diferentes tipos de cultivo (Rodríguez *et al.*, 2009; FIA, 2011).

Los nemátodos son animales invertebrados, no segmentados, de cuerpo cilíndrico y elongado cuyo tamaño varía entre 0,1 mm y varios metros de largo. Poseen un completo sistema digestivo, reproductivo y muscular, un simple sistema excretor y nervioso y carecen de sistema circulatorio y respiratorio (Koppenhöfer, 2007).

Entre los nemátodos, existen 23 familias descritas que establecen relaciones simbióticas con insectos, abarcando desde foresis hasta parasitismo (García del Pino, 1994; Koppenhöfer, 2007). De ellas, siete familias han sido las más estudiadas como potenciales agentes controladores biológicos de insectos plagas de suelo: Mermithidae y Tetradonematidae (Orden: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae y Sphaerulariidae (Orden: Tylenchida); Steinernematidae y Heterorhabditidae (Orden: Rhabditida). Las dos últimas han sido las más estudiadas como posibles agentes de control biológico de plagas de insectos que pasan alguna etapa de su ciclo de vida en el suelo (Koppenhöfer, 2007; Morton, 2009) y actualmente, sólo los nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae se utilizan como controladores biológicos y son producidos comercialmente en muchas partes del mundo (Koppenhöfer, 2007).

Los NEP tienen la capacidad de matar a ciertos insectos hospederos, debido a la relación que establecen con una bacteria, la cual enferma y mata a dicho hospedero. Este proceso toma normalmente entre 1 a 4 días dependiendo del NEP y del hospedero (Koppenhöfer, 2007).

En particular, los NEP del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* establecen una relación simbiótica con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae), respectivamente (García del Pino, 1994; Koppenhöfer, 2007), las cuales se encuentran en el tracto intestinal de los NEP (Koppenhöfer y Fuzy, 2007) y son liberadas al hemocele del insecto hospedero a través de sus fecas una vez ocurrida la penetración (Van Driesche *et al.*, 2007), mecanismo mediante el cual los NEP logran parasitar a sus hospederos. Éste es un proceso activo, en el cual los NEP juveniles infecciosos (JI) entran directamente por las aberturas naturales o a través de secciones delgadas de la cutícula (Smart, 1995).



Luego de 48 a 72 horas de ocurrida la penetración, NEP y bacterias superan la respuesta inmune del hospedero, provocando su muerte por septicemia (Smart, 1995; Koppenhöfer y Fuzy, 2007; Van Driesche *et al.*, 2007). La bacteria se propaga dentro del huésped y evita la colonización por otros microorganismos, mientras que los NEP desarrollan entre 1 a 3 generaciones, alimentándose de la bacteria y de los tejidos del hospedero metabolizados por éstas. Una vez agotados los recursos alimenticios, los JI emergen en búsqueda de un nuevo huésped (Koppenhöfer y Fuzy, 2007).

Los JI, o también llamados larvas dauer, corresponden al tercer estado juvenil, donde los NEP son infectivos, y además, es la única etapa donde éstos sobreviven en el suelo, sin alimentarse ni desarrollarse (Koppenhöfer, 2007), hasta encontrar e infectar a un hospedero (Koppenhöfer y Fuzy, 2006). La estrategia de búsqueda de los JI varía en las distintas especies de NEP, denominándose emboscadores a aquellos que esperan su presa y navegadores a aquellos que la buscan activamente (Koppenhöfer y Fuzy 2007). La localización del hospedero es realizada de forma activa por los NEP en respuesta a diferentes estímulos físicos y químicos, tales como gradientes de temperatura, gradientes de CO<sub>2</sub> y excreción de los insectos en el suelo (García del Pino, 1994). Por ello, la capacidad de los JI para dispersarse y persistir hasta que puedan encontrar un hospedero es fundamental para el éxito del NEP (Koppenhöfer y Fuzy, 2006).

La sobrevivencia, movilidad y dispersión de los nemátodos puede estar influenciada por la interacción de diversos factores, tanto intrínsecos (comportamiento, fisiología, características genéticas, entre otras) como extrínsecos (temperatura, humedad, textura y estructura del suelo, humedad relativa, radiación UV) (Kaya, 1990).

En el caso de los factores extrínsecos, las características y propiedades del suelo, como la estructura y textura de éste pueden determinar las diferentes habilidades de los organismos que en él habitan. En el caso de los NEP, por ejemplo, el tamaño y espacio de los poros de suelo puede restringir o facilitar su movilidad y capacidad de desplazamiento. Así mismo, la distribución y cantidad de agua en los poros puede afectar su actividad, debido a que los NEP necesitan agua libre para permanecer activos y circular a través del suelo. La distribución y tamaño de poros, además afecta las relaciones hospedero-depredador (Elliott y Coleman, 1988).

En el suelo, los JI se mueven a través de películas de agua en los espacios intersticiales o en los poros llenos de agua, cuyo diámetro sea mayor que el cuerpo de los nemátodos; así, el movimiento de estos es óptimo si el espesor de la película de agua es la mitad de su cuerpo. En consecuencia, cuando el suelo comienza a secarse y la película de agua disminuye, se restringe el movimiento de los nemátodos (Wallace, 1958).

Siendo el suelo un sistema dinámico, en él ocurren permanentemente múltiples variaciones en propiedades como densidad aparente, contenido de materia orgánica, pH, etc., los cuales muchas veces dependen del manejo. Por ejemplo, la aplicación de materia orgánica al suelo, utilizado usualmente en la agricultura tradicional (Haynes y Naidu 1998) y orgánica (Julca *et al.*, 2006), se relaciona directamente con la fertilidad y productividad de los suelos usados para cultivar (Labrador *et al.*, 1993).

Barzegar *et al.* (2002), muestran que la aplicación de materia orgánica al suelo, aumenta de forma significativa la estabilidad de los agregados y la tasa de infiltración, además disminuye la densidad aparente del suelo, es decir, aumenta la porosidad.

La aplicación de materia orgánica en el suelo puede tener además otros efectos. Un ejemplo de esto es descrito por Julca *et al.* (2006), quienes mencionan que la aplicación de humus de lombriz o vermicompost al suelo, afecta las propiedades físicas de éste, ya que forma agregados y da estabilidad estructural; además, al unirse a las arcillas y formar el complejo de cambio, se favorece la penetración y retención del agua, disminuyendo la erosión y favoreciendo el intercambio gaseoso.

El vermicompost corresponde a los desechos de la digestión de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* (Savigny) (Haplotaxida: Lumbricidae), al alimentarse de residuos orgánicos. Éste se utiliza como fertilizante y se conoce como humus de lombriz. Su aplicación mejora la estructura del suelo, ya que aumenta la aireación, disminuye la compactación, incrementa la actividad microbiana y previene el desarrollo de organismos patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2010).

Es por esto que al desarrollar estrategias de aplicación o mejoramiento del control biológico de plagas del suelo, es importante considerar el suelo como un ambiente complejo, ya que puede proveer condiciones físicas, tanto favorables como desfavorables, para la sobrevivencia y la actividad de los NEP (Barbercheck, 1992, Julca *et al.*, 2006). Según Koppenhöfer (2007), resulta difícil hacer generalizaciones para cada tipo de suelo en el efecto específico sobre el desempeño de los NEP.

Por ejemplo, Obando *et al.* (2008) y MacMillan *et al.* (2009) observaron que el desplazamiento de distintas cepas de NEP, fue mayor en medios orgánicos que en suelos minerales, y que la aplicación de abonos orgánicos al suelo tiene una influencia positiva sobre las propiedades físicas de éste, lo que favorece la dispersión de los nemátodos y por ende la localización e infección de los hospederos.

Debido a que Chile es un país con una amplia variedad de ecosistemas, se asume que existe una amplia fauna de NEP con un rango de adaptaciones medioambientales locales (Edgington *et al.*, 2010). De hecho, en el año 1990 se inició una colección de recursos genéticos microbianos en todo el país. Entre las colectas, destacan las realizadas entre los años 2006 y 2010, bajo el contexto del proyecto “Conserving and using entomopathogenic fungi and nematodes within Chile”, el cual fue desarrollado entre INIA Quilamapu y CABI Europe-UK. Los resultados de ese trabajo, significaron una gran incorporación de microorganismos a la Colección Chilena de recursos genéticos microbianos (CChRGM), y el importante descubrimiento de tres nuevas especies de NEP: *Steinernema unicornum*, *S. australe* y *Heterorhabditis atacamensis*. En el año 2012, el CChRGM tomó el estatus de autoridad internacional de depósito, único en la zona de Latinoamérica y el Caribe. A la fecha, cuentan con 103 aislados de NEP (CChRGM, s.f.), las que pueden ser adquiridas comercialmente por otras instituciones con fines de investigación.

Así mismo, el laboratorio de Nematología Agrícola de la Universidad de Chile, en conjunto con la empresa Bioagro S.A., realizaron una prospección en la Región de la

Araucanía, encontrando en la localidad de Licán Ray las especies *S. feltiae*; *S. unicornium* y una especie denominada *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, que podría corresponder a una especie no descrita o estar asociada a *S. weiseri* o *S. feltiae* (Flores, 2012). Mucho del material que ha sido colectado en las últimas décadas aún no se ha estudiado, pero existe un gran potencial en las colecciones para el desarrollo de formulaciones para el control microbiológico de plagas agrícolas.

Estudios que evalúen las características de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray como agente de control biológico están en este momento en desarrollo en la Universidad de Chile, con resultados promisorios en relación a su capacidad como controlador biológico de plagas del suelo (Aballay y Lankin, 2014<sup>1</sup>, comunicación personal). Sin embargo, por ser una especie descubierta recientemente, aún hay muchos aspectos que se desconocen.

Considerando estudios previos presentes en la literatura científica (Barbercheck, 1992; Barzegar *et al.*, 2002, Julca *et al.*, 2006), en el presente estudio se evaluó la capacidad de desplazamiento de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en un suelo de textura franca con distintos contenidos y estados de descomposición de materia orgánica, utilizando la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) como hospedero.

Los resultados de este estudio aportarán en el conocimiento de esta especie y, consecuentemente, permitirán tomar decisiones en el uso futuro de este agente para el control de plagas de interés agronómico.

---

<sup>1</sup> Aballay, E. Ing. Agrónomo, Ph.D. Nematólogo y Lankin, G. Ing. Agrónomo, Ph. D. Entomóloga. NEP como agentes de control biológico. 2014, may. [Entrevista personal] Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

### **Hipótesis**

-La materia orgánica del suelo incide en la capacidad del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray para desplazarse.

### **Objetivo general**

-Evaluar el efecto de la materia orgánica del suelo sobre la capacidad de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray de ubicar e infectar a su hospedero.

### **Objetivos específicos**

-Evaluar el efecto del contenido de la materia orgánica del suelo sobre la mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray bajo condiciones controladas.

-Evaluar el efecto del estado de descomposición de la materia orgánica del suelo sobre la mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray bajo condiciones controladas.

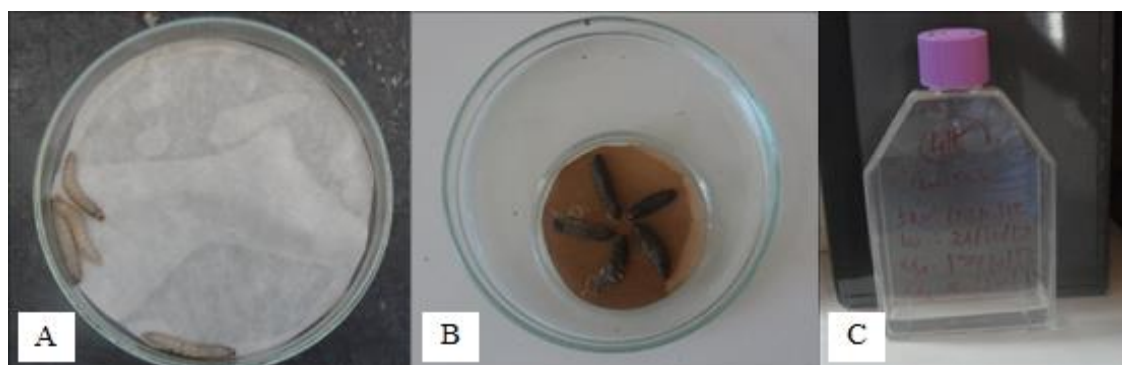
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

El estudio se realizó durante agosto de 2013 a marzo de 2014, en los Laboratorios de Nematología y Entomología del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en Av. Santa Rosa n° 11315, Comuna de La Pintana, Santiago de Chile.

### Crianza del nemátodo entomopatógeno

El NEP nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray se obtuvo de la colección del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile. Para reproducir el nemátodo, se utilizó el método *in vivo* siguiendo el protocolo descrito por Kaya y Stock (1997), a través de la técnica de la trampa modificada de White (1927). Para desarrollar esta técnica, primeramente se prepararon cámaras de infección (Figura 1A) en placas Petri de 10 cm de diámetro con papel filtro estéril en la base y sobre éste 5 larvas de último estadio de *G. mellonella*. Sobre el papel se distribuyó 1 mL de solución de agua destilada con 100 JI larva<sup>-1</sup> (Lindegren *et al.*, 1993; Realpe *et al.*, 2007). Las placas se llevaron a cámaras de cultivo Velp científica® Foc 225E a una temperatura de 25 ± 2 °C. Luego de 2 días, se retiraron las larvas que presentaron signos de infección (cambio de color, ablandamiento) (Realpe *et al.*, 2007) y se dispusieron en trampas White (Figura 1B). Éstas consisten en una placa Petri de 5 cm de diámetro con papel filtro estéril en la base, sobre el cual se disponen larvas infectadas. Esta placa se introduce dentro de otra de mayor tamaño con agua destilada. Los NEP migran naturalmente desde el cadáver del hospedero hacia el agua destilada en la placa de mayor tamaño. Posteriormente se colectan los nemátodos, se lavan y se guardan en forma horizontal en frascos de cultivo identificando especie y fecha de colección, bajo condiciones de temperatura 4 ± 3 °C hasta su uso (Koppenhöfer, 2007) (Figura 1C).



**Figura 1.** Proceso de obtención de nuevas generaciones de NEP. (A): Cámara de infección, (B): Trampa White, (C): Frasco de cultivo.

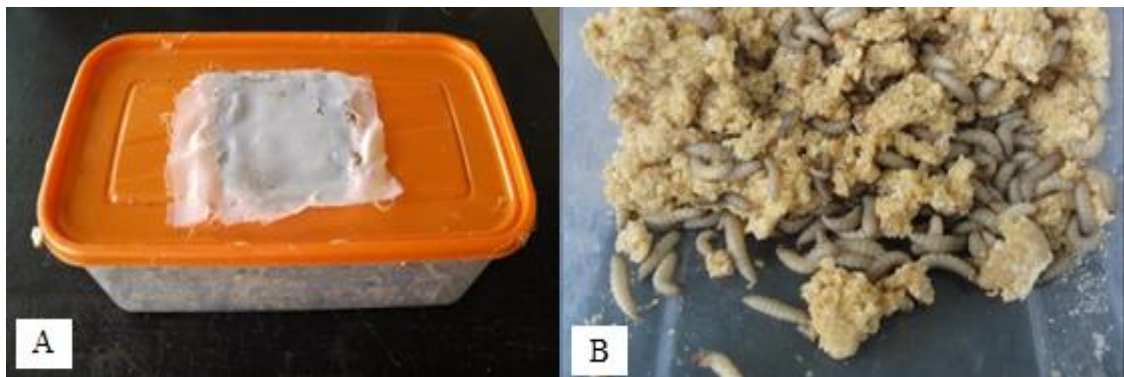
## Crianza del hospedero

Se utilizó como hospedero larvas de la polilla mayor de la cera, *G. mellonella*, especie empleada de manera estándar en estudios y producción *in vivo* de NEP, debido a su alta susceptibilidad a la mayoría de cepas de NEP, fácil crianza y altos rendimientos de NEP (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002). Como material inicial se usaron huevos de *G. mellonella* obtenidos desde una colonia mantenida en el Laboratorio de Entomología de Cultivos de la Universidad de Chile, y la crianza se realizó en base a una dieta artificial propuesta por Contreras (2011), que se detalla en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Ingredientes para aproximadamente 1 kg de dieta para Larvas de *G. mellonella*.

| Componente           | Cantidad |
|----------------------|----------|
| Nestum 5 cereales®   | 187 g    |
| Nestum avena y miel® | 187 g    |
| Azúcar granulada     | 148 g    |
| Germen de trigo      | 120 g    |
| Agua destilada       | 100 mL   |
| Glicerina líquida    | 200 mL   |
| Jarabe Pantiban      | 2 mL     |

Se mezclan por separado los ingredientes sólidos y líquidos más el azúcar, una vez disueltos se mezclan, revolviendo hasta obtener una dieta completamente homogénea. Los huevos de *G. mellonella* se colocaron dentro de contenedores plásticos de 24 • 8 • 5 cm<sup>3</sup>, con aproximadamente 500 gr de dieta. Se perforó la tapa y se colocó malla galvanizada con tul para permitir el intercambio gaseoso (Figura 2A). Los contenedores se mantuvieron en una cámara de crianza General Electric® con temperatura controlada, a 23 ± 2 °C (Realpe *et al.*, 2007) y se revisaron periódicamente, monitoreando el crecimiento de las larvas (Figura 2B). Al emerger los adultos, éstos se pusieron en frascos de vidrio con tapa, malla galvanizada y tul. Dentro del frasco se puso un trozo de papel mantequilla como sustrato de ovoposición (Figura 3). Los frascos se rotularon y mantuvieron en cámaras de crianza a una temperatura de 23 ± 2 °C. El proceso se repitió una vez que se obtuvieron nuevos huevos.



**Figura 2.** Crianza de *G. mellonella*. (A) Contenedor plástico con tapa, (B): Contenedor con larvas de *G. mellonella* sobre dieta.



**Figura 3.** Frasco de ovoposición con adultos de *G. mellonella*.

### Suelo y Materia Orgánica

Se utilizó suelo de textura franca, perteneciente a la Serie Santiago, obtenido desde un campo experimental ubicado en la Comuna de La Pintana, Santiago de Chile. La materia orgánica (M.O.) se agregó como vermicompost, obtenido desde la planta de reciclaje y lombricultura de residuos orgánicos, ambos lugares pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Algunas propiedades físicas y el contenido de materia orgánica del suelo utilizado se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Propiedades físicas del suelo utilizado: retención de agua (porcentaje volumétrico) a capacidad de campo (CC %), punto de marchitez permanente (PMP %) y humedad aprovechable (HA %). Textura de acuerdo a los porcentajes de arcilla (A), limo (L) y arena (a).

| Clase textural | M.O. (%) | Capacidad de retención de agua volumétrica (%) |     |    | Textura (%) |      |      |
|----------------|----------|--|-----|----|-------------|------|------|
|                |          | CC   | PMP | HA | a           | A    | L    |
| Franca         | 2,1      | 22   | 14  | 8  | 38,8        | 20,8 | 40,4 |

Fuente: CIREN (1996), Laboratorio de Física de Suelos, Universidad de Chile (2014).

Se utilizó vermicompost en distintos grados de descomposición, correspondiendo a los estados inicial, intermedio y avanzado, dados por el tamaño de partícula (Figura 4) y análisis químico de las muestras. El análisis químico del vermicompost utilizado se presenta en el Cuadro 3.



**Figura 4.** A: M.O. inicial, B: M.O. intermedia, C: M.O. avanzada.

**Cuadro 3.** Contenido de materia orgánica, carbono orgánico, nitrógeno, nitrato, amonio y relación C/N del vermicompost en distintos grados de descomposición.

| Muestra    | M.O. (%) | C orgánico total (%) | N total (%) | C/N | Nitrato (mg/kg) | Amonio (mg/kg) |
|------------|----------|----------------------|-------------|-----|-----------------|----------------|
| Inicial    | 85       | 49,7                 | 2,66        | 19  | 147             | 142            |
| Intermedio | 18       | 10,5                 | 1,26        | 8   | 495             | 28             |
| Avanzado   | 18       | 10,5                 | 0,98        | 11  | 335             | 18             |

Fuente: Laboratorio de Química de Suelos y Aguas, Universidad de Chile (2014).

El vermicompost fue tamizado a 3 mm para el estado inicial y 2 mm, para los estados intermedio y avanzado, luego mezclado con el suelo de acuerdo a los porcentajes que conformarían los tratamientos. Posteriormente y para descartar la posible presencia de cualquier microorganismo, las mezclas correspondientes a todos los tratamientos fueron expuestas a temperaturas sobre 70°C por tres horas (Aballay, 2013<sup>2</sup>, comunicación personal). Para esto se puso cada mezcla, humedecida previamente, en una bolsa plástica para esterilizar, y ésta en un recipiente metálico, de 30 cm de diámetro y 50 cm de alto, el cual se introdujo en otro recipiente metálico de 90 cm de diámetro y 70 cm de alto, relleno con agua y tapado (Figura 5). Los recipientes se calentaron sobre una cocina para que el agua se mantuviera en ebullición durante el tiempo requerido. La temperatura del suelo se controló con un termómetro cada media hora.



**Figura 5.** Tratamiento de suelo con altas temperatura.

<sup>2</sup> Aballay, E. Ing. Agrónomo, Ph.D. Nematólogo. Tratamiento de suelo con altas temperaturas. 2013, nov. [Entrevista personal]. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.



Una vez realizados estos pasos, las mezclas fueron guardadas en bolsas plásticas y congeladas en un freezer Ilshin® a  $-80^{\circ}\text{C}$  para detener el proceso de descomposición de la materia orgánica.

Cada mezcla se descongeló antes de ser usada y se llevó a capacidad de campo, poniéndolas en distintos baldes de 5 litros y regando con agua destilada hasta saturación. Se esperó 48 horas para que drenara el agua (Vidal, 2015) y se llenó la arena experimental con la mezcla correspondiente a cada tratamiento. Para homogenizar la temperatura de cada tratamiento, el procedimiento anterior se realizó en cámaras a  $24^{\circ}\text{C}$ .

### Arena Experimental

La arena experimental consistió en un tubo de PVC de 30 cm de largo y 7 cm de diámetro con una tee de PVC de 7,5 cm de diámetro (Figura 6), con el extremo inferior tapado. El tubo se llenó con la mezcla de suelo y materia orgánica correspondiente a cada tratamiento, y se instaló una trampa hecha con una placa Petri de 5 cm de diámetro, con ambas caras modificadas, cambiando parte del plástico por malla galvanizada. Dentro de la placa se agregó suelo de la mezcla correspondiente y 5 larvas de *G. mellonella* de último estadio y 0,20 g de peso aproximadamente cada una (Figura 7). La trampa se ubicó a 20 cm desde el punto de inoculación (Figura 8). Cada tubo se inoculó con una solución de NEP cuya dosis correspondió  $1 \times 10^6$  NEP  $\text{m}^{-2}$  (4400 NEP  $\text{tubo}^{-1}$ ) dado que esta concentración, en estudios previos, ocasionaron un 100% de mortalidad en larvas de *G. mellonella* en suelo de textura franca (Vidal, 2015). La inoculación se realizó usando una pipeta. Posteriormente, los tubos se llevaron a una cámara con temperatura controlada a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , se cubrieron las aberturas restantes con placa Petri de cara modificada con malla galvanizada y fueron puestos de forma vertical.

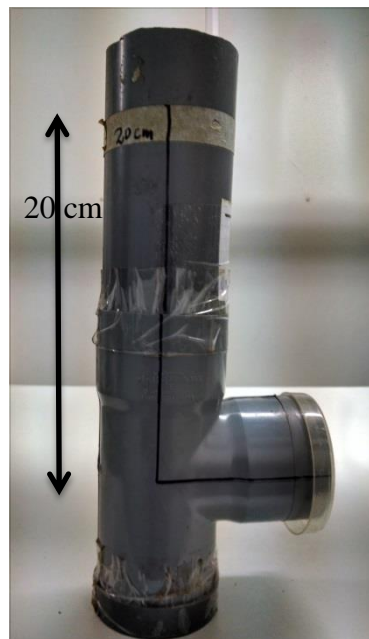
Las placas con larvas fueron revisadas cada 48 horas y aquellas que presentaron síntomas de ataque (cambio de color y consistencia) y/o muerte se lavaron con agua destilada y se traspasaron a trampas White para verificar si la infección ocurrió efectivamente por el ataque de los NEP.



**Figura 6.** Arena experimental.



**Figura 7.** A: Trampa de *G. mellonella*. B: Trampa dispuesta en la arena experimental.



**Figura 8.** Arena experimental y distancia desde la ubicación de la trampa hasta el punto de inoculación, 20 cm en disposición vertical.

## Tratamientos

Los tratamientos que se utilizaron, en base al contenido de materia orgánica y su estado de descomposición, se presentan en el Cuadro 4. Se agregó la cantidad de vermicompost necesaria para completar el porcentaje de materia orgánica correspondiente a cada tratamiento.

Se contó con un tratamiento control, que consistió en el suelo con su contenido natural de materia orgánica, expuesto a altas temperaturas para disminuir la carga microbiológica y posteriormente congelado como las otras mezclas. Además, se incluyó otro tratamiento al que se le llamó control negativo, que consistió en el mismo suelo, el cual se incineró en una mufla LabTech® a 360°C por 16 horas, para lograr la eliminación completa de la materia orgánica natural presente en la muestra.

Para evaluar el efecto del estado de descomposición y cantidad de materia orgánica del suelo sobre el desplazamiento de los NEP, se llenó cada arena experimental con una mezcla de suelo y materia orgánica (vermicompost) en distintos estados de descomposición y en distintas dosis medidas en porcentajes p/p (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Estados de descomposición y cantidad de materia orgánica utilizada en los tratamientos.

| Tratamiento | Estado de descomposición de la materia orgánica | Dosis de materia orgánica añadida (%p/p) | Materia orgánica final (%) |
|-------------|---|--|----------------------------|
| 1           | Inicial   | 2  | 4                          |
| 2           |   | 4  | 6                          |
| 3           |   | 6  | 8                          |
| 4           | Intermedio                                      | 2  | 4                          |
| 5           |   | 4  | 6                          |
| 6           |   | 6  | 8                          |
| 7           | Avanzado  | 2  | 4                          |
| 8           |   | 4  | 6                          |
| 9           |   | 6  | 8                          |
| 10          | Desconocido                                     | 0  | 2                          |
| 11          | -   | 0  | 0 (calcinado)              |

### **Diseño experimental**

Se realizó un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA), con estructura factorial 3 x 3, donde los factores correspondieron a:

- Tres dosis de materia orgánica incorporadas al suelo: 2, 4 y 6%.
- Tres estados de descomposición de la materia orgánica: inicial, intermedio y avanzado.
- Cada bloque contó con dos tratamientos control: uno con la materia orgánica presente de manera natural en el suelo y otro con suelo calcinado.

La unidad experimental correspondió a una placa Petri con 5 larvas de *G. mellonella* y se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Se bloqueó de acuerdo a la fecha en que se realizaron las repeticiones.

### **Evaluación**

Se midió la capacidad de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray de desplazarse e infectar a su hospedero a través de la mortalidad de larvas de *G. mellonella*. Las revisiones se realizaron cada 48 horas y aquellas larvas que presentaron signos de ataque (cambio de color, consistencia y mortalidad) se colocaron en trampas White para verificar emergencia de nemátodos. Se descontó de las larvas muertas aquellas en las que no se verificó emergencia de NEP.

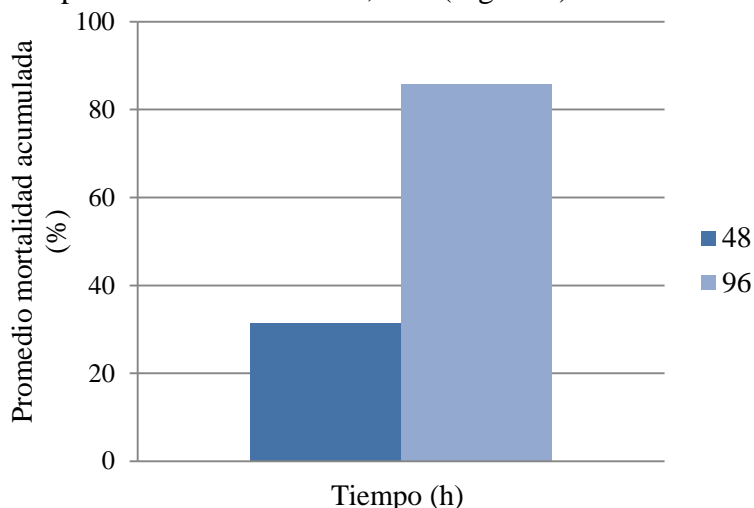
### **Análisis Estadístico**

La mortalidad de larvas se expresó como porcentaje y los resultados se normalizaron mediante la transformación angular de Bliss. En los análisis para cada uno de los factores, no se incluyeron los tratamientos 10 y 11, dado que en éstos no había dosis de materia orgánica añadida, ni estado de descomposición conocido. Sin embargo, los resultados de estos tratamientos se incluyeron al hacer una comparación de mortalidad entre todos los tratamientos, utilizando un diseño en bloque completamente aleatorizado. Para evaluar las posibles diferencias entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y el test de comparación múltiple de Tukey, con un 5% de significancia, utilizando el programa estadístico Infostat®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Mortalidad de larvas de *G. mellonella* a las 48 y 96 h de medición

La mortalidad promedio acumulada de larvas de *G. mellonella* a las 48 horas luego de la inoculación de los tratamientos, fue de 31,27%, mientras que a las 96 horas la mortalidad en promedio ascendió a 85,81% (Figura 9).



**Figura 9.** Mortalidad promedio (%) acumulada en el tiempo (h) para todos los tratamientos.

A las 96 horas la mortalidad acumulada entre los tratamientos 1 al 10, como se observa en la Figura 9, es superior al 80%, lo que concuerda con lo observado por Vidal (2015), en ensayos de características similares, donde la mortalidad de larvas de *G. mellonella* en suelo de textura franca a igual dosis de NEP, fue entre 80-100% luego de 6 días post aplicación del mismo aislado de NEP. El tiempo para lograr la mortalidad máxima en este estudio además coincide a lo observado por Obando *et al.* (2008), donde a las 96 horas el *Steinernema* sp. alcanzó la mayor mortalidad en larvas de *Astaena* sp. (Coleoptera: Melolonthidae) y se acerca a lo obtenido por Delgado-Ochica y Sáenz (2012), donde distintos aislados de NEP lograron la mayor mortalidad en larvas de *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) entre las 48 y 72 horas. Cabe mencionar que el tratamiento 11, con suelo calcinado, está incluido en el promedio y por lo tanto en esta figura, pero la mortalidad en este tratamiento fue 0% a las 96 horas.

Conjuntamente, este tiempo se ajusta a lo descrito por Koppenhöfer (2007) para nemátodos entomopatógenos, lograr la muerte del hospedero entre 1 a 4 días después de la inoculación.

Los síntomas de infección por NEP en las larvas de los tratamientos 1 al 10, se observaron desde las 48 horas después de realizada la inoculación, manifestándose a través de la reducción de la movilidad y cambio de color, tornándose de un amarillo

suave a marrón oscuro, además de flacidez (Figura 10 A) y posteriormente mortalidad, sin presentar mal olor.



**Figura 10.** (A): Síntomas de ataque en larvas de *G. mellonella* por NEP; (B): Comparación de larvas muertas por NEP, causas desconocidas y larva viva, respectivamente (izquierda a derecha).

Una vez puestos los cadáveres de las larvas en trampas White, los nemátodos pudieron apreciarse al interior de éstas, desde donde posteriormente emergieron y se movilizaron hacia el agua (Figura 11).



**Figura 11.** NEP emergiendo desde cadáveres del hospedero, larvas de *G. mellonella*, dispuestas en trampas White.

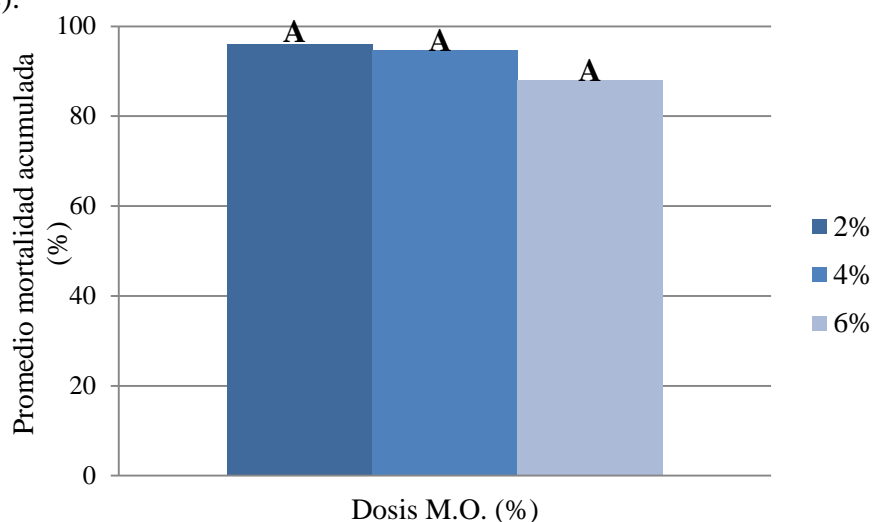
Como se mencionó anteriormente, el tratamiento 11 con suelo calcinado, a las 96 horas no presentó mortalidad ni síntomas de infección por NEP, por lo que fue revisado nuevamente 48 horas más tarde (144 horas luego de la inoculación). Sin embargo, las larvas muertas a la tercera medición no presentaron los síntomas característicos de infección por NEP (Figura 10 B) y se presume que su muerte fue por inanición y falta de oxígeno, aun así, las larvas fueron puestas en trampas White y, como se esperaba, no se observó emergencia de NEP.

### Interacción entre dosis de M.O. (%) y su grado de descomposición

El análisis estadístico sugiere que no hay interacción entre los factores “estado de descomposición” y “dosis de M.O.” ( $P > 0,15$ ), por lo que se procedió a analizar los resultados para cada uno de los factores por separado.

#### Mortalidad de larvas de *G. mellonella* en suelos de textura franca con distintas dosis de materia orgánica, inoculados con el NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray

A las 96 horas de la inoculación de las arenas experimentales, los tratamientos 1 al 9 presentaron mortalidad superior al 80% en todas las repeticiones, donde aquellos a los que se les adicionó una dosis de 2% de materia orgánica (tratamientos 1, 4 y 7) presentaron una mortalidad promedio de 96%, seguido de los tratamientos con adición de 4% de M.O. (tratamientos 2, 5 y 8) con 94,7% de mortalidad en promedio y en tercer lugar los tratamientos con 6% de materia orgánica (tratamientos 3, 6 y 9), presentando un promedio de 88% de mortalidad. Sin embargo, estos porcentajes no fueron suficientes para establecer una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 12).



**Figura 12.** Mortalidad acumulada (%) de *G. mellonella* 96 horas después de la aplicación del NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray a un suelo franco con distintas concentraciones de M.O. (% p/p). Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas, según test de Tukey  $p \leq 0,05$ .

La falta de diferencias significativas entre las distintas concentraciones de M.O., coincide con los ensayos realizados por Obando *et al.* (2008), donde se incorporó vermicompost en concentraciones de 10, 30 y 50% a un suelo inoculado con un aislado de *Steinernema* sp. nativo Colombiano, donde la mortalidad de larvas de *Astaena* sp. no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos y por lo tanto, en cualquiera de las concentraciones de vermicompost hubo una buena capacidad infectiva de los nemátodos sobre las larvas. Estas autoras, además compararon la incorporación de distintos

sustratos orgánicos al suelo, siendo gallinaza, vermicompost y compost los utilizados, no existiendo diferencias estadísticas en la utilización de uno u otro sustrato, ya que bajo estos tres la mortalidad de larvas fue superior al 50%. De esta forma, las autoras concluyeron que la aplicación de abonos orgánicos tiene una influencia positiva sobre las propiedades físicas del suelo, lo que favorece la dispersión de los NEP en éste y por ende la localización e infección de larvas de *Astaena* sp.

Así mismo, estudios de Williams *et al.* (2013), muestran que los NEP *Heterorhabditis downesi* (Stock, Griffin and Burnell) y *Steinernema carpocapsae* (Weiser), cuyas formas de desplazamiento corresponden a navegador y emboscador respectivamente, presentan mayor eficacia en el control del gorgojo del pino *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) cuando son aplicados en suelos orgánicos que en suelos minerales, sugiriendo que los suelos orgánicos favorecen el desplazamiento activo y pasivo de los NEP, y promueven la supervivencia y dispersión de éstos una vez aplicados al suelo.

Otro caso es el observado por MacMillan *et al.* (2009), quienes encontraron que el desplazamiento del NEP *Phasmarhabditis hermaphrodita* (A. Schneider) fue mayor en un suelo de textura franco arcillosa que en un suelo de textura franco arenosa, debido a que el primero mostró una tendencia a formar agregados de mayor tamaño dentro de la matriz suelo. Sin embargo, el movimiento realizado en aquellos suelos fue drásticamente menor que el ocurrido en medios orgánicos formados por turba, hojarasca y chips de corteza, cuyo movimiento fue de menor a mayor respectivamente por cada material, siguiendo consecuentemente el tamaño de poros. A esto se agrega una recuperación de nemátodos, mucho mayor que en los suelos minerales. Estos resultados también se aplican a NEP de hábitos emboscadores, pues Kruitbos *et al.* (2009), demostraron que *S. carpocapsae* mostró un aumento en el comportamiento de agitación del cuerpo cuando se encontraba en sustratos como hojarasca y turba, en comparación con suelos de textura franca y franco arenosa.

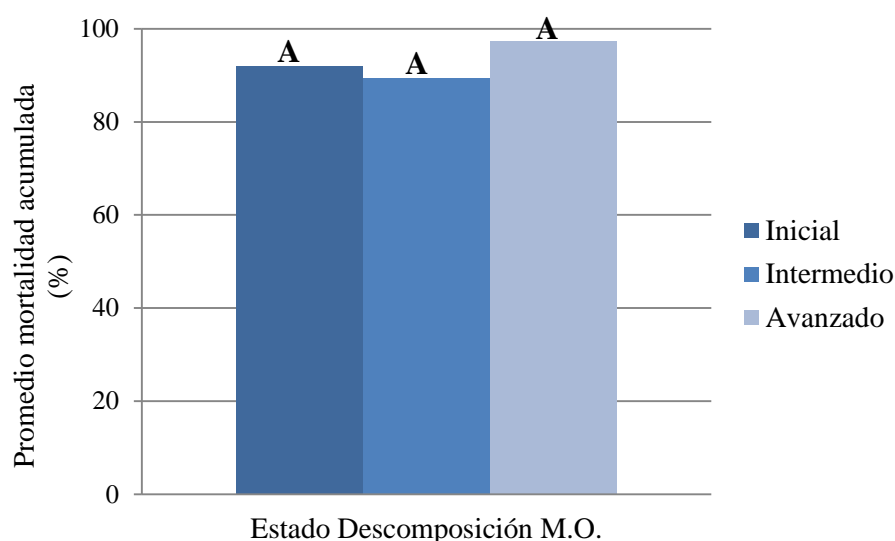
Este estudio, al igual que los anteriormente descritos, confirma el efecto beneficioso de la materia orgánica, como vermicompost, aplicada al suelo en distintas dosis, para el desplazamiento de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, dado que localizó e infectó a su presa en un tiempo reducido, lográndose mortalidad superior al 80% en todas las repeticiones, en aquellos tratamientos que contenían algún porcentaje de materia orgánica.

Esto puede ser explicado, por el hecho que sustratos como la materia orgánica, en general, tienen una mayor porosidad y un porcentaje superior de poros de mayor tamaño que los suelos minerales (Burés, 1997), de esta forma, la materia orgánica en el suelo influencia el aumento de la porosidad y con ello el aumento de la tasa de infiltración y retención de agua, además de favorecer el intercambio gaseoso (Barzegar *et al.*, 2002, Julca *et al.*, 2006). Esto se traduce en vías de dispersión menos tortuosas y por lo tanto se reduce el tiempo de búsqueda, movimiento y energía que utiliza el nemátodo para navegar en este medio (MacMillan *et al.*, 2009).



**Mortalidad de larvas *G. mellonella* en suelos de textura franca en mezcla con materia orgánica en distintos estados de descomposición, inoculados con el NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray**

A las 96 horas luego de la inoculación de las arenas experimentales, los tratamientos 1 al 9 presentaron mortalidad superior al 80% en todas las repeticiones. Los tratamientos con un estado avanzado de descomposición de la materia orgánica (tratamientos 7, 8 y 9), presentaron un 97% de mortalidad promedio, seguido por los tratamientos con materia orgánica en un estado de descomposición inicial (tratamientos 1, 2 y 3), presentando mortalidad de 92% en promedio, y finalmente por los tratamientos que poseían un estado intermedio de descomposición de la materia orgánica (tratamientos 4, 5 y 6) con 89% de mortalidad en promedio. Sin embargo, estos porcentajes no fueron suficientes para establecer una diferencia significativa entre ellos (Figura 13).



**Figura 13.** Mortalidad acumulada (%) de *G. mellonella* 96 horas después de la aplicación del NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray a un suelo franco con distintos estados de descomposición de M.O. (sin considerar % de materia orgánica). Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas, según test de Tukey  $p \leq 0,05$ .

Según Shapiro *et al.* (1996), el estado de descomposición de la materia orgánica puede alterar la virulencia de los NEP, ya que los compuestos nitrogenados reducen su sobrevivencia. Los autores observaron que el estiércol de vaca fresco disminuye los niveles de virulencia de *S. carpocapsae* en laboratorio y terreno, en tanto el estiércol de vaca compostado no afecta su virulencia

Sin embargo, la falta de diferencias significativas entre los distintos estados de descomposición de la M.O. (Figura 13) en este estudio, podría deberse a que tanto el suelo como la materia orgánica fueron expuestos a altas temperaturas y posteriormente congelados y, en consecuencia, se estancó el proceso de descomposición de la materia orgánica, y con ello la liberación de compuestos ácidos, cambios en el pH, etc., que

pudieran haber afectado el comportamiento de los NEP. De hecho, los gases resultantes de la degradación de la materia orgánica aplicada al suelo, en conjunto con el aumento de temperatura en este proceso, pueden ser utilizados como biofumigantes para el control de organismos patógenos de vegetales, tal como ciertos aislados de nemátodos fitoparásitos (Carrasco y Riquelme, 2006).

No obstante, Bednarek y Gaugler (1997), sostienen que la aplicación de abonos orgánicos, como estiércol animal, favorecen el establecimiento de los NEP, además del aumento de su densidad en el suelo y su reciclaje.

Resultados similares a los del presente trabajo, fueron registrados por MacMillan *et al.* (2009), donde los medios orgánicos utilizados (turba, hojarasca y chips de corteza) también fueron esterilizados, encontrando que el NEP *P. hermaphrodita* se desplazó mayormente y se recuperaron más generaciones de nemátodos en éstos, que en suelos minerales.

Así mismo, Ishibashi y Kondo (1986), determinaron mortalidad de *G. mellonella* inoculando con NEP tratamientos conformados por suelo arenoso y compost de corteza, tanto esterilizado como no esterilizado, obteniendo como resultado mortalidad mayor de larvas y mayor sobrevivencia de NEP en medios esterilizados.

Los antecedentes sugieren entonces que, para que exista un efecto del estado de descomposición de la materia orgánica sobre los NEP, ya sea en su supervivencia o movilidad, ésta no debe estar expuesta a altas temperaturas o autoclavada, así los productos resultantes durante el proceso de estabilización, la relación C/N, pH, temperatura, microorganismos presentes, entre otros, pueden ejercer una influencia positiva o negativa sobre el comportamiento de los NEP y a la vez causar diferentes interacciones con ellos.

### Comparación de la mortalidad de larvas *G. mellonella* entre todos los tratamientos inoculados con el NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray

Al evaluar si existen diferencias entre los tratamientos, considerando tanto el suelo sin agregación de materia orgánica externa y el suelo calcinado, los resultados muestran que las diferencias entre los tratamientos no son estadísticamente significativas, excepto al realizar la comparación con el tratamiento 11, suelo calcinado (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Mortalidad acumulada de larvas de *G. mellonella*, para cada tratamiento.

| Tratamientos             | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7  | T8  | T9 | T10 | T11 |
|--------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|
| Mortalidad acumulada (%) | 96 | 96 | 84 | 92 | 88 | 88 | 100 | 100 | 92 | 92  | 0   |
| Test Tukey (95%)         | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A   | A   | A  | A   | B   |

Lo anterior, muestra que la mortalidad ocurrida entre los tratamientos 1 al 10, varía entre 84 y 100%, siendo los tratamientos 7 y 8 (dosis de M.O. de 2 y 4% respectivamente, en estado de descomposición avanzado) los que presentan la mortalidad máxima. Por otro lado, en el tratamiento con suelo calcinado no ocurre mortalidad de larvas de *G. mellonella* en ninguna de las repeticiones.

De esta forma, los resultados señalan que la materia orgánica del suelo influye positivamente en el desplazamiento del NEP *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, no importando su cantidad, dado que en aquellos tratamientos que poseían algún porcentaje de materia orgánica ocurrió mortalidad de larvas. A partir de esto se deduce también que los nemátodos se desplazaron en búsqueda de su hospedero. Vidal (2015), asocia este aislado de NEP con un hábito navegante o mixto, debido a que es capaz de desplazarse en busca de su presa, captando las señales generadas desde ésta, ocurriendo en este caso, un desplazamiento vertical de 20 cm. En el suelo donde no existía materia orgánica los nemátodos no se desplazaron, por lo que esta resultaría fundamental para asegurar la sobrevivencia del NEP. Lo anterior, puede explicarse por el hecho que la materia orgánica influye positivamente sobre las propiedades del suelo y el funcionamiento de los ecosistemas (Baldock y Nelson, 2000).

Por ejemplo, entre los efectos que ejerce la materia orgánica sobre las propiedades físicas del suelo, están la influencia sobre la estructura y porosidad. Aunque el suelo dentro de la arena experimental perdió su estructura original, y pudo haberse comprimido por efecto de fuerza al introducir el suelo en ellas, originando una disminución del volumen de poros internos (Burés, 1997), las sustancias húmicas del vermicompost permitirían cementar las partículas de suelo y formar agregados de una determinada cohesión que favorecerían la existencia de macroporos entre agregados, generando procesos de circulación de agua, aire y calor (Labrador *et al.*, 1993).

Esto es corroborado por Haynes y Naidu (1998), Barzegar *et al.* (2002), Julca *et al.* (2006) y Obando *et al.* (2008), quienes observaron que la aplicación de estiércol en el primer caso, materia orgánica en el segundo y humus de lombriz en los últimos dos, aumentaron la estabilidad de los agregados y con ello se favoreció la tasa de infiltración,

retención de agua en el suelo y el intercambio gaseoso, indispensables para la supervivencia, actividad parasítica, infectividad y dispersión de los NEP.

De la porosidad depende la retención de agua y su permeabilidad en el suelo (Burés, 1997). Es así como la humedad del suelo es el principal factor que afecta la actividad de los nemátodos en este medio (Kaya, 1990), debido a que los NEP necesitan agua libre para permanecer activos y circular a través del suelo (Elliott y Coleman, 1988).

Por ejemplo, Köppenhöfer *et al.* (1995), demostraron que *Steinernema glaseri* (Steiner) no se estableció en larvas de *G. mellonella* cuando la humedad del suelo se encontró por debajo de -50 kPa. Posteriormente, Köppenhöfer y Fuzy (2007) encontraron que la infectividad de los NEP *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), *H. zealandica*, *Steinernema scarabaei* (Stock y Köppenhöfer) y *S. glaseri.*, aplicados en un suelo de textura franco arenosa con 2,3% de materia orgánica, sobre *Popillia japónica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) fue mayor en suelos con humedad moderada (-10 a -100 kPa), mientras que tendió a disminuir en suelos húmedos (-1kPa) y moderadamente secos (-1000 kPa). En consecuencia, cuando el suelo comienza a secarse y la película de agua disminuye, se restringe el movimiento, establecimiento, persistencia e infectividad de los NEP (Wallace, 1958). Así mismo, si hay exceso de agua en el suelo, disminuye el nivel de oxígeno, al igual que la sobrevivencia de los NEP.

Debido a que en el tratamiento con suelo calcinado no hubo falta de humedad, la no ocurrencia de mortalidad de larvas no puede atribuirse al contenido de agua, sino a la estructura del suelo y a ciertas propiedades que la conforman. Inicialmente, se observó un cambio de color en el suelo luego de ser calcinado, siendo más claro, en comparación con el suelo que no lo fue. Posteriormente, al agregarle agua se dispersó, formándose una masa compacta, adhesiva y plástica, lo que pudo haber provocado la disminución del espacio poroso, del tamaño de poros y en consecuencia, el diámetro de éstos no fue suficiente para que los nemátodos los traspasaran; de esta forma, no se movilaron y no atacaron a su presa. Sin embargo, este escenario no sería representativo de la realidad, dado que no existen suelos agrícolas sin materia orgánica.

Finalmente, los nemátodos entomopatógenos, en particular *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, son agentes de control biológico que tienen potencial para ser utilizados en predios que se fertilizan a través de la incorporación de productos u enmiendas orgánicas, especialmente si éstas se encuentran estabilizadas. Es por esto que estudios futuros deben considerar además el efecto de las propiedades químicas, tanto del suelo como del fertilizante sobre la compatibilidad, actividad y persistencia de los NEP, así como también la interacción que puede ocurrir entre planta-NEP-insecto.

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se desarrolló este ensayo, es posible concluir que:

En un suelo sin materia orgánica no hay infección, por lo tanto, se puede inferir que *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray no se desplaza al hospedero a la distancia medida.

La movilidad de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, no se ve afectada por niveles de materia orgánica entre 2 y 6% ni por su grado de descomposición.

*Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray causa mortalidad mayor al 80% en promedio, en larvas de último estadio de *G. mellonella* a las 96 horas después de realizada la inoculación, en tratamientos que contenían algún porcentaje de M.O. y bajo condiciones controladas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baldock, J. and P. Nelson. 2000. Soil organic matter. (pt. B, pp. 25-84). *In*: Sumner, M. (Ed.). Handbook of soil science. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press. 2142 p.
- Barbercheck, M. 1992. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *The Florida Entomologist*, 75(4): 539-548.
- Barzegar, A.; A. Yousefi and A. Daryashenas. 2002. The effect of addition of different amounts and types of organic material on soil physical properties and yield of wheat. *Plant and Soil*, 247: 295-301.
- Bednarek, A. and R. Gaugler. 1997. Compatibility of soils amendments with entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 29(2): 220-227.
- Burés, S. Sustratos. 1997. Ediciones Agrotécnicas. Madrid, España: [s.n.]. 342 p.
- Carrasco, J. y S. Riquelme, (Eds.). 2006. Alternativas de desinfección se suelo en la producción de tomates en invernadero de Colín, Villa Alegre, Chile. (Bol. N° 155), Centro Regional de Investigación Raihuén, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Región del Maule, Chile: INIA. 105p.
- CChRGM (Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos). s. f. [En línea]. Chillán, Chile Recuperado en: <<http://www.cchrgm.cl/nosotros.html> > Consultado el: 20 junio 2014.
- CIREN (Centro de Información de Recursos Naturales), Chile. 1996. Estudio agrológico Región Metropolitana: descripciones de suelos materiales y símbolos. Santiago, Chile: CIREN. 425p.
- Contreras, L. 2011. Utilización de un extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) para el control de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidóptera: Pyralidae). Memoria Ingeniero Agrónomo. Valdivia, Chile: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 54h.
- Delgado-Ochica, Y. Y A. Sáenz. 2012. Virulencia, producción y desplazamiento de nemátodos entomopatógenos sobre larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. *Universitas Scientiarum*, 17(3): 283-290.
- Edgington, S.; A. Buddie; D. Moore; A. France; L. Merino; L. Tymo et al. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology*, 12(6): 915-928.
- Elliott, E. and D. Coleman. 1988. Let the soil work for us. *Ecological Bulletins*, 39: 23-32.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria), Chile. 2011. Resultados y lecciones en el biocontrol del cabrito de los frutales con nemátodos entomopatógenos: proyecto de innovación en regiones del Biobío, de La Araucanía, de Los Ríos y de Los Lagos, valorización a marzo de 2011. Santiago, Chile: FIA 28p. (Serie Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario N° 89: Biocontrol).

Flores, P. 2012. Caracterización morfológica y molecular de un aislamiento nativo de *Steinernema* sp. de la zona centro sur de Chile. Tesis de Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 54h.

García del Pino, F. 1994. Los nemátodos entomopatógenos: (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Memoria Doctoral en Ciencias Biológicas. Barcelona, España: Facultad de Ciencias, Universidad autónoma de Barcelona. 78h.

Haynes R. and R. Naidu. 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51: 123-137.

Ishibashi, N. and E. Kondo. 1986. *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. *Journal of Nematology*, 18(3): 310-316.

Julca, A.; L. Meneses, R. Blas y S. Bello. 2006, ene.-abr. La materia orgánica, importancia y experiencias en su uso en la agricultura. *IDESIA*, 24: 49-61.

Kaya, H. 1990. Soil ecology. (cap. 3, pp. 93-115). In: Gaugler, R. and Kaya, H. (Eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press. 365p.

Kaya, H and P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology (cap. 6, pp. 281-314). In: Lacey, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. San Diego, E.E.U.U.: Academic Press. 395p.

Koppenhöfer, A. 2007. Nematodes. (cap. 5, pp. 249-264). In: Lacey, L. and Kaya H. (Eds.). Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. 2nd ed. [s.l.]: Springer Netherlands. 868p.

Koppenhöfer, A. and E. Fuzy. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 11-22.

Koppenhöfer, A. and E. Fuzy. 2007. Soil moisture effect on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glasieri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*, 35: 128-139.

Koppenhöfer, A.; H. Kaya and S. Taormino. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 193-199.

Kruitbos, L.; S. Heritage; S. Hapca and M. Wilson. 2009. Influence of substrate on the body-waving behavior of nematodes. *Nematology*, 11(6): 917-925.

Labrador J.; A. Guiberteau, L. López y J. Reyes. 1993. La materia orgánica en los sistemas agrícolas: Manejo y utilización. Junta de Extremadura, Madrid, España: Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 44p. (Colección hojas divulgadoras N°3).

Lindgren, J.; K. Valero and B. Mackey. 1993. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *Journal of Nematology*, 25(2): 193-197.

MacMillan K.; S. Haukeland; R. Rae; I. Young; J. Crawford; S. Hapca et al. 2009. Dispersal patterns and behavior of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in mineral soils and organic media. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1483-1490.

Merino, L. y A. France. 2009, may.-jun. Nemátodos entomopatógenos: Control biológico de insectos de importancia económica. *INIA Tierra Adentro*, 84: 24-25.

Morton, A. 2009. Los nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Tesis Doctoral. Barcelona, España: Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 179h.

Obando, D.; L. Castillo y C. Salazar. 2008. Evaluación de la capacidad infectiva del nematodo *Steinernema* sp. bajo diferentes sustratos orgánicos para el control de chisa *Astaena* sp. (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista de las Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño*, 25 (1-2): 44-62.

Realpe, A.; P. Bustillo y J. López. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nemátodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2): 142-157.

Rodríguez, D.; M. Torres; L. Uribe y L. Flores. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 171-182.



Sepúlveda, F.; F. Tapia y S. Ardiles. 2010, abr. Beneficios de la materia orgánica en los suelos. (Inf. N° 23). Centro de investigación especializado en agricultura del desierto y altiplano (CIE), Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Ururi. Arica y Parinacota, Chile: INIA. 4p.

Shapiro-Ilan, D. and R. Gaugler. 2002. Production technology for Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 137-146.

Shapiro-Ilan, D.; G. Tylka and L. Lewis. 1996. Effects of fertilizers on virulence of *Steinernema carpocapsae*. *Applied Soil Ecology*, 3: 27-34

Smart, G. 1995, dec. Viewpoint: Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. Supplement to the Journal of Nematology (Supl.). 27(4s): 529-534.

Van Driesche, R. G.; M. S. Hoddle y T. D. Center. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. E. Ruiz; J. Coronada (Trad.). Estados Unidos: United States Department of Agriculture, USDA; Forest Health Technology Enterprise Team, FHTET. 751p. (Biological Control).

Vidal, G. 2015. Efecto de la textura del suelo sobre la capacidad de desplazamiento e infectividad en laboratorio de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray. Tesis de Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 55h.

Wallace, H. 1958. Movement of eelworms. *Annals of Applied Biology*, 46: 74–85.

White, G. 1927. A method for obtaining infective nematodes larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.

Williams, C.; A. Dillon; R. Girling and C. Griffin. 2013. Organic soils promote the efficacy of entomopathogenic nematodes, with different foraging strategies, in the control of a major forest pest: A meta-analysis of field trial data. *Biological Control*, 65: 357-364.