

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DEL ATAQUE DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS
DEL GÉNERO *Steinernema* SOBRE EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA
(*Agrotis bilitura* Guenée) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

ELIANA AURORA BURGOS MEDINA

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DEL ATAQUE DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS
DEL GÉNERO *Steinernema* SOBRE EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA
(*Agrotis bilitura* Guenée) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**EFFECT OF THE ATTACK OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES
NATIVES OF THE GENUS *Steinernema* ON POTATO CUTWORM (*Agrotis bilitura*
Guenée) UNDER LABORATORY CONDITIONS**

ELIANA AURORA BURGOS MEDINA

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFECTO DEL ATAQUE DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS
DEL GÉNERO *Steinernema* SOBRE EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA
(*Agrotis bilitura* Guenée) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniera Agrónoma

ELIANA AURORA BURGOS MEDINA

PROFESORES GUÍAS	CALIFICACIONES
Sr. Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph. D.	7,0
Sra. Gabriela Lankin V. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph. D.	7,0
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Nicola Fiore Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.	6,0
Sr. Cristian Kremer F. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,6

Santiago, Chile

2017

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este trabajo a mis padres, Francisco y Otilia, y a mis hermanos Edgardo y Scarleth.

A mis profesores guías, Erwin Aballay y Gabriela Lankin.

A mis amigos de universidad, Eduardo, Vildo, Diego, Hugo, Maca, y Carlotta, por toda su amistad y apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

A Oscar, por todo su apoyo durante la realización de esta memoria, sus palabras de aliento y de comprensión, su compañía, muchas gracias por todo.

A todas aquellas personas que se han convertido en parte importante de mi vida, y que han seguido apoyándome hasta el día de hoy.

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis.....	7
Objetivo.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Lugar de estudio.....	8
Multiplicación de Nematodos Entomopatógenos	8
Crianza de <i>Agrotis bilitura</i>	9
Suelo.....	11
EXPERIMENTOS	12
Experimento 1. Determinación de la mortalidad de <i>A. bilitura</i> con NEP en placa Petri .	12
Experimento 2. Determinación de la mortalidad de <i>A. bilitura</i> con NEP en macetas	14
Experimento 3. Determinación de la mortalidad de <i>G. mellonella</i> con NEP en macetas	15
Diseño experimental.....	16
RESULTADOS.....	17
Experimento 1. Determinación de la mortalidad de <i>A. bilitura</i> con NEP en placa Petri .	17
Experimento 2. Determinación de la mortalidad de <i>A. bilitura</i> con NEP en macetas	19
Experimento 3. Determinación de la mortalidad de <i>G. mellonella</i> con NEP en macetas	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

Al desarrollarse en el suelo, las larvas de *Agrotis bilitura* (Lepidoptera: Noctuidae) se alimentan tanto de plántulas como de las partes subterráneas de plantas en cultivos hortícolas. Los estadios L3-L6 son los más dañinos, provocando pérdidas de hasta el 100% en ataques severos. El control de esta plaga con insecticidas es ineficiente, debido a los refugios que ofrece el suelo. En este contexto, los nematodos entomopatógenos (NEP) pueden ser una alternativa de gran valor en el control de ésta y otros insectos plaga que utilizan este hábitat, por su habilidad de moverse activamente en el perfil del suelo en busca de hospederos.

Los NEP del género *Steinernema* (Steinernematidae) cuentan con un estado infectivo (IJ), el que ingresa al cuerpo del hospedero por heridas o aberturas naturales, liberando en su interior una bacteria simbiote del género *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae), la cual provoca la muerte del insecto por septicemia en un período de 24 a 48 horas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la mortalidad de larvas L4 de *A. bilitura* causada por el ataque de dos aislamientos de nematodos entomopatógenos nativos del género *Steinernema* en condiciones de laboratorio. Para esto se realizaron tres experimentos de laboratorio. En el primer y segundo experimento se evaluó la mortalidad causada por ambos aislamientos nativos de NEP sobre larvas L4 de *A. bilitura* en placas Petri y en macetas con suelo, respectivamente. En el tercer experimento, y con el fin de validar los resultados obtenidos, se evaluó la mortalidad causada por ambos aislamientos nativos de NEP sobre larvas L4 de *G. mellonella* en macetas. Se utilizó concentraciones de 600 y 1200 IJ mL⁻¹ en placa Petri de los aislamientos “Licán Ray” y “Chillán 4” respectivamente, y 4400 IJ mL⁻¹ en maceta para ambos aislamientos. Las larvas de *A. bilitura* resultaron altamente susceptibles a la infección por estos aislamientos, superando el 90% y 60% de mortalidad, tanto en placas como en macetas, respectivamente, valores que se alcanzaron entre el día 3 y 6 después de la inoculación a 25 ± 2 °C. Las larvas de *G. mellonella* también fueron susceptibles a ambos aislamientos, alcanzando una mortalidad promedio de 63%, entre el día 4 y 6 después de la inoculación.

Los resultados sugieren que ambos aislamientos nativos de *Steinernema* sp. tienen potencial para ser incluidos en un bioinsecticida para el control de esta plaga.

Palabras clave: Steinernematidae, control biológico, *Xenorhabdus*, plagas de hortalizas.

ABSTRACT

Larvae of *Agrotis bilitura* (Lepidoptera: Noctuidae) develop in the soil, feeding on subterranean parts of plants in vegetable crops. The larval stages L3-L6 are the most damaging, causing up to 100% loss in severe attacks. Control of this pest with insecticides is inefficient, because they are sheltered by the soil. In this context, entomopathogenic nematodes (EPN) can be a valuable alternative in controlling this and other insect pests that use this habitat, due to their ability to move in the soil profile in search of hosts.

Entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* (Steinernematidae) have an infective state (IJ), which enters the host through wounds or natural body openings, releasing a symbiotic bacteria of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae), which usually kill the host within 24–48 h.

The ability of two native strains of the genus *Steinernema* to infect and cause mortality in *A. bilitura* was evaluated through three experiments under laboratory conditions. The first and second experiment evaluated the mortality caused by two native strains of EPN on L4 larvae of *A. bilitura* in Petri dishes and pots with soil, respectively. In order to validate the results, the third experiment evaluated the mortality caused by both EPN native isolates on L4 larvae of *G. mellonella* in potted soil. Concentrations of 600 and 1200 IJ mL⁻¹ was used in the Petri dish experiment with the "Licán Ray" and "Chillán 4" isolates respectively, and 4400 IJ mL⁻¹ for the experiments in pots for both isolates.

Agrotis bilitura larvae were highly susceptible to infection by these isolates, exceeding 90% and 60% mortality, in Petri dishes and pots, respectively. These values were reached between day 3 and 6 post inoculation at 25 ± 2 °C. *Galleria mellonella* larvae were also susceptible to both isolates, reaching an average mortality of 63% between day 4 and 6 post inoculation.

The results obtained suggest that both native isolates of *Steinernema* sp have the potential to be included in biopesticide formulas for controlling this pest.

Keywords: Steinernematidae, biological control, *Xenorhabdus*, horticultural insect pests.

INTRODUCCIÓN

Las plagas agrícolas que dañan los cultivos de hortalizas son de gran importancia en Chile, ya que aproximadamente 68.191 ha. están destinadas a este uso (ODEPA, 2017). Entre las plagas más importantes se encuentran aquellas que desarrollan uno o más estadíos en el suelo, como los “gusanos cortadores”, lepidópteros de la familia Noctuidae (Carrero y Planes, 2007), donde el género *Agrotis* es uno de los más importantes en Chile y en otras partes del mundo. Representantes de este género, tales como *A. bilitura*, *A. ipsilon* y *A. lutescens*, entre otros, se caracterizan por pasar sus estados larvarios en el suelo, donde se alimentan de una gran diversidad de especies hortícolas, cultivos anuales y malezas (Artigas, 1994).

Agrotis bilitura Guenée (Lepidóptera: Noctuidae) presenta una distribución Neotropical, encontrándose a lo largo de todo Chile, donde puede completar de 1 a 3 ciclos en el año, siendo la papa, maíz, tomate, pimiento, alcachofa, remolacha y espárrago sus principales hospederos. Una hembra adulta puede colocar 100 o más huevos, pudiendo completar un ciclo en 2 a 3 meses. Los estadíos que provocan el mayor daño son los estados larvales L3 a L6. *Agrotis bilitura* inverna en los primeros 5 a 15 cm del suelo, principalmente en sus dos últimos estadíos larvales, y excepcionalmente, como pupa. Las larvas poseen hábitos de alimentación nocturnos, lo que hace difícil percibir su presencia y generan considerables daños en la etapa de establecimiento de los cultivos, provocando pérdidas de hasta el 100% en ataques severos. Por esto, se han estimado niveles de daño económico tan bajos como 1 larva por 6 plántulas en cultivos jóvenes. En Perú es una plaga de gran importancia en tabaco, y además este género es cuarentenario para Estados Unidos (González, 1989; Artigas, 1994; Carrillo *et al.*, 2001; SAG, 2015).

En superficies pequeñas, los gusanos cortadores se han controlado convencionalmente con bromuro de metilo (CH_3Br) con el que se trata el suelo antes del establecimiento de los cultivos, pero debido al cumplimiento del Protocolo de Montreal, Chile debió disminuir el uso de compuestos como CH_3Br a partir del 2008, y posteriormente, el 1 de enero del año 2015, se prohibió la importación de éste (MMA, 2011). En superficies más grandes, otra práctica muy utilizada después del establecimiento de los cultivos, es la aplicación de insecticidas de amplio espectro como los Organofosfatos y Piretroides, los cuales actúan principalmente por inhalación, contacto e ingestión (SAG, 2017). La eficiencia de esta práctica es baja, ya que el suelo provee refugio, y la efectividad del compuesto químico utilizado se ve alterado y disminuido por volatilización y las propiedades del suelo, siendo necesarias más de una aplicación del producto para asegurar un resultado óptimo de control (Barrios, 2010). Además, el uso de plaguicidas de síntesis química, al ser altamente tóxicos y contaminantes, producen una serie de consecuencias negativas para el ser humano y medio ambiente, entre las que se pueden mencionar la disminución de la biodiversidad, muerte de organismos benéficos para el ecosistema, tales como enemigos naturales, lombrices y abejas (Devine, 2007; Badii y Varela, 2015), además son responsables del

desarrollo de resistencia en los insectos debido a la exposición repetida y frecuente a estos productos (Bisset *et al.*, 1999).

De acuerdo a estos antecedentes y a las nuevas exigencias de los mercados externos en cuanto a la calidad y buenas prácticas agrícolas, y con el fin de asegurar productos más inocuos, saludables y con un menor impacto ambiental (Torrado, 2006), se han buscado y desarrollado nuevas estrategias de control de plagas, como el control biológico (CB), una de las herramientas incluidas en programas de manejo integrado de plagas (MIP) y en agricultura orgánica (FAO, 2003). El CB consiste en la utilización de organismos vivos, los enemigos naturales —los que pueden ser artrópodos depredadores o parasitoides, virus, bacterias, hongos o nematodos— para mantener las plagas a niveles de densidad poblacional que no causen daño económico (Ehler, 1990). Dentro de los agentes utilizados en CB de plagas que pasan algún estado de desarrollo en el suelo, los nematodos entomopatógenos (NEP) son de gran valor por su habilidad de moverse en el perfil del suelo en busca de un hospedero (Alekseev *et al.*, 2006).

En relación a su movilidad, los NEP presentan dos estrategias de búsqueda de su hospedero. Los de hábitos “*cruisers*” o de persecución, se caracterizan por buscar activamente a su hospedero en el suelo, en base a estímulos físicos y químicos generados por éstos, mientras que los de hábitos “*ambushers*” o de emboscada, esperan y emboscan al hospedero, lo que permite que ataquen plagas poco o altamente móviles. Los de hábitos de emboscada presentan un comportamiento adaptativo para alcanzar a su hospedero, presentando comportamientos de salto y nictación, este último consiste en la inmovilización de un extremo de su cuerpo y el ondeo activo del otro (Campbell and Gaugler, 1993; Campbell *et al.*, 2003).

Además de la capacidad de encontrar a su hospedero en hábitats protegidos como el suelo, los NEP presentan otras ventajas en el control de plagas: bajo impacto en el medio ambiente, vertebrados y plantas, son fáciles de propagar y almacenar por largos períodos de tiempo en condiciones controladas de temperatura, los que van desde los 5-6 meses a 25 °C, a los 12 meses a 8 °C, además se pueden aplicar con los mismos equipos que los insecticidas convencionales para plaguicidas, recomendándose dosis de $0,1 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^5$ IJ m⁻², y son compatibles con el uso de numerosos plaguicidas químicos (Gaugler y Kaya, 1990; Alves, 1998; Sánchez y Rodríguez, 2008; Sharma *et al.*, 2011; Shapiro-Illan *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de los NEP consta de huevo, cuatro estados juveniles (J1 a J4) y adulto. El estado J3 es el estado infectivo, denominado *dauers* o juveniles infectivos (IJ) y mantiene la cutícula del estado J2 (Hazir *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2005). Los IJ ingresan al hospedero a través de sus aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) o heridas, y una vez que alcanzan el hemocele, liberan bacterias simbiotas que se encuentran en la porción ventricular de su intestino, y que destruyen los tejidos internos del hospedero generando la muerte del insecto por septicemia en un período entre 24 a 48 horas, creando un medio favorable para la alimentación y reproducción de los NEP (Kaya y Stock, 1997; Burnell y

Stock, 2000) (Figura 1). Entre las familias de NEP más utilizadas están Steinernematidae y Heterorhabditidae, que se asocian de manera simbiote con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, las cuales presentan un amplio espectro de hospederos (Griffin *et al.*, 2005).

Los NEP pueden desarrollar de 1 a 3 generaciones al interior de su hospedero dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, donde la bacteria simbiote produce antibióticos para inhibir el crecimiento y colonización de otros microorganismos patógenos (Hazir *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2005). Al disminuir la disponibilidad de alimento se produce competencia entre los NEP, lo que lleva a la producción de nuevas generaciones de IJ, encargados de buscar y colonizar nuevos hospederos. Desde el hospedero pueden emerger desde 50.000 a más de 300.000 IJ al cabo de 6 a 10 días a 24 °C, dependiendo del aislamiento de NEP, tamaño del hospedero, y condiciones ambientales (Grewal *et al.*, 1994a).

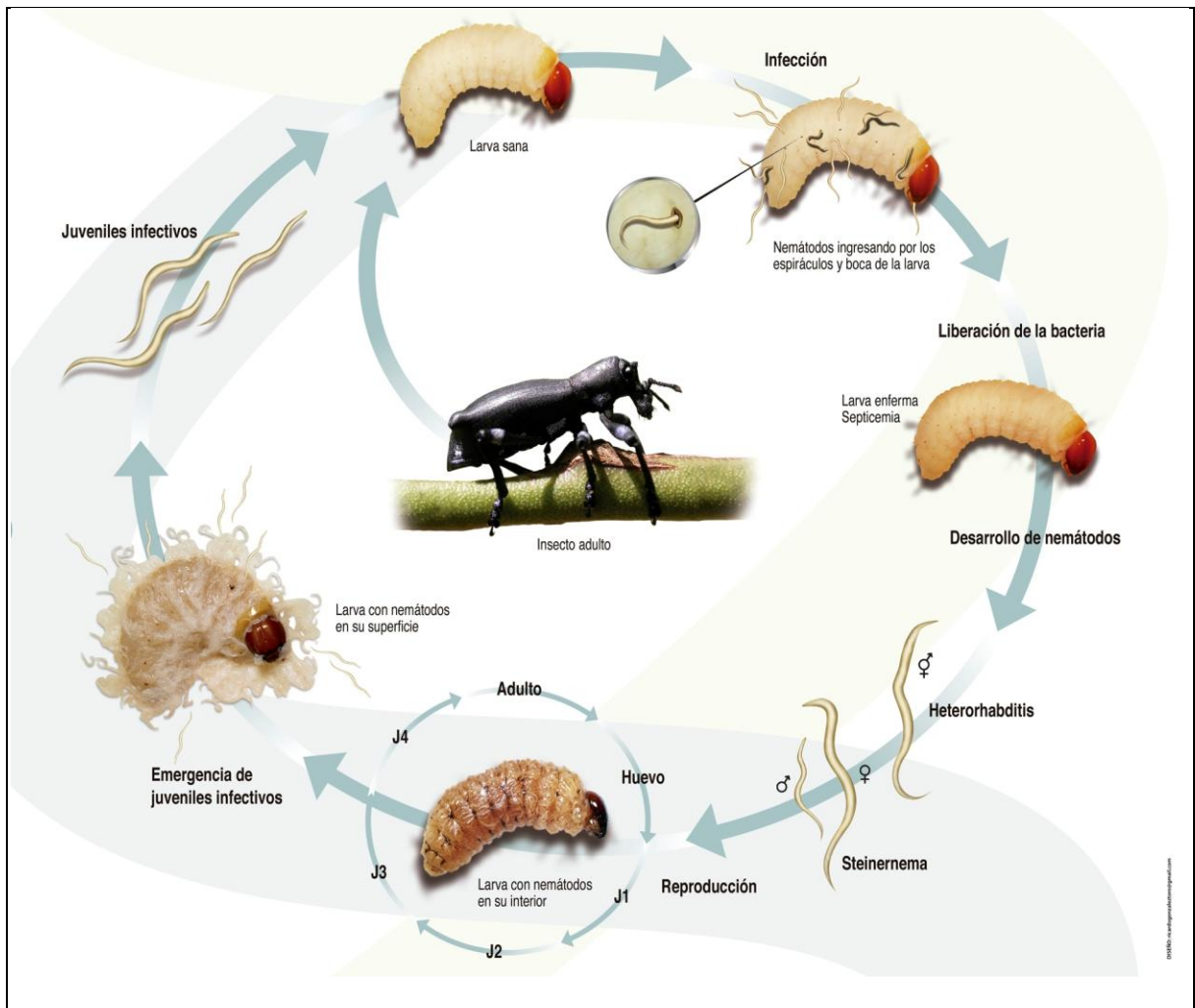


Figura 1. Ciclo de vida de NEP del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Urtubia *et al.*, 2015).

Se ha visto que la eficacia del uso de NEP para el control de plagas depende tanto de la especie o aislamiento de NEP, como de la compatibilidad con el hospedero, así como de su capacidad de penetración y de características del hospedero, como grado de susceptibilidad de la especie y edad. Además, los factores abióticos como temperatura, aireación, humedad, textura y contenido de materia orgánica del suelo, entre otros, pueden favorecer la detección del hospedero y la reproducción de los NEP (Koppenhöfer *et al.*, 1995).

En Chile aún no se han desarrollado productos comerciales como bioinsecticidas a base de NEP, sin embargo, entre los antecedentes que existen del uso de NEP en Chile para el control de plagas del suelo, se puede mencionar la investigación realizada por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) para controlar especies de la familia Curculionidae como el Capachito de los Frutales (*Asynonychus cervinus* Boh.), Cabrito del Duraznero (*Aegorhinus superciliosus* G.) y el Gorgojo de los Invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus* F.) (Merino y France, 2009), y la efectividad del género *Steinernema* en el control de *Dalaca pallens* B. (Lepidoptera: Hepialidae) (Maldonado, 2009). En el 2017, INIA Quilamapu, celebró el término del proyecto FONDEF “Fermentación y formulaciones de Nematodos Entomopatógenos nativos (NEPs) para el control biológico de plagas de importancia agrícola” el cual logró generar un formulado en gel de NEPs, siendo el primer paso para llegar a un producto comercial (France y Urtubia, comunicación personal)¹. Así mismo, en América del Sur existen investigaciones realizadas en el uso de *Heterorhabditis* sp. para el control de coleópteros de la familia Melolonthidae como *Phyllophaga menetriesi* B. y *Anomala inconstans* Burm. en Colombia y control de *Phyllophaga elenans* en Costa Rica (Melo *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

En relación al control de gusanos cortadores con estos organismos, en Estados Unidos se ha estudiado el uso de NEP del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* para el control de los distintos estadios larvarios del gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon* Hufn.) en condiciones de laboratorio, donde se registró mortalidad de 90-100% entre 5 a 7 días desde la inoculación de los NEP (Capinera *et al.*, 1988; Ebssa y Koppenhöfer, 2012).

En Chile, el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile cuenta con dos aislamientos nativos de NEP, ambos pertenecientes al género *Steinernema*: “Licán Ray” y “Chillán 4”. Por ser nativos, estos aislamientos presentarían mayores ventajas adaptativas a las condiciones de suelo y clima presentes en el país. El aislamiento nativo Licán Ray procede de un bosque de roble ubicado en la localidad de Licán Ray, comuna de Villarrica, IX Región de la Araucanía (Alvarado, 2012), y podría pertenecer al grupo *feltiae* (Flores, 2012), mientras que el aislamiento “Chillán 4” procede de la ciudad de Chillán, ubicada en la VIII Región del Bío-Bío. Ambos aislamientos han sido reproducidos desde su colecta por cultivo *in vivo* en laboratorio utilizando larvas de la Polilla de la Cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).

¹ France y Urtubia. 2017, mayo. Centro Tecnológico de Control Biológico. [Comunicación personal]. Chillán, INIA Quilamapu.

Observaciones preliminares en placas Petri, nos indican que ambos aislamientos causan mortalidad a larvas de la familia Noctuidae, sin embargo no se conocen mayores detalles de esta interacción. Es por ello que en este estudio se evaluó la mortalidad del estadio larval L4 de *A. bilitura* causada por los NEP *Steinernema* sp. aislamientos “Licán Ray” y “Chillán 4” tanto en placas Petri como en macetas con suelo.

Hipótesis

Larvas L4 de *Agrotis bilitura* son susceptibles al ataque de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema*.

Objetivo

Evaluar la mortalidad de larvas L4 de *A. bilitura* causada por el ataque de dos aislamientos de NEP nativos del género *Steinernema* en condiciones de laboratorio, en placas Petri y maceta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en los Laboratorios de Entomología de Cultivos, y Nematología, ambos pertenecientes al Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicado en la comuna de La Pintana, Santiago, Región Metropolitana.

Se realizaron tres experimentos, para los cuales se esterilizó las placas Petri, papel filtro, y suelo antes de iniciar los ensayos. Los demás materiales mencionados en el método, fueron sanitizados con una solución de etanol al 70% antes de ser utilizados.

Multiplicación de Nematodos Entomopatógenos

Los aislamientos nativos de NEP, “Licán Ray” y “Chillán 4”, pertenecientes al género *Steinernema* fueron entregados por el laboratorio de Nematología, y se multiplicaron *in vivo* en larvas de *G. mellonella* en crianzas que mantienen los laboratorios de Nematología y Entomología de Cultivos, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

La crianza de ambos aislamientos de NEP se realizó según el protocolo descrito por Kaya y Stock (1997), utilizando larvas de último estadio de *G. mellonella*. Se inocularon 6 larvas con una solución de 1 mL de NEP con 600 IJ, las que posterior a su muerte se colocaron en trampas White. Ésta consiste en una placa Petri de 9 cm por 1,5 cm con agua destilada, dentro de la cual se coloca otra placa Petri de 5 cm x 1 cm con papel filtro (Whatman No.1) seco sobre el que se depositan las larvas con síntomas de infección por NEP. Tras su emergencia desde el hospedero, al cabo de 10 días, se colectaron los IJ (Figura 2) y se almacenaron en agua destilada a una temperatura de 8 °C hasta su uso, no más allá de un mes.



Figura 2. Trampa White, NEP emergiendo desde larvas de *G. mellonella* infectadas.

Crianza de *Agrotis bilitura*

Hembras adultas de *A. bilitura* se colectaron utilizando trampas de luz, entre octubre y noviembre 2013, en la Región Metropolitana, Chile. Se trasladaron al laboratorio en recipientes plásticos de manera individual. En el laboratorio se colocó a las hembras en recipientes con una solución azucarada y se llevaron a cámara de crianza a una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16L: 8O (Carrillo *et al.*, 2001). Las hembras que estaban grávidas al momento de la captura colocaron huevos en el recipiente, por lo que se cambiaron a un nuevo recipiente cada 24 horas, separando así los huevos por edad. Los huevos de cada recipiente (correspondientes a 24 horas de ovipostura de la misma hembra) se removieron con ayuda de un pincel fino (Artel, N° 5, pelo suave) y se colocaron sobre papel absorbente humedecido en placas Petri (Figura 3).

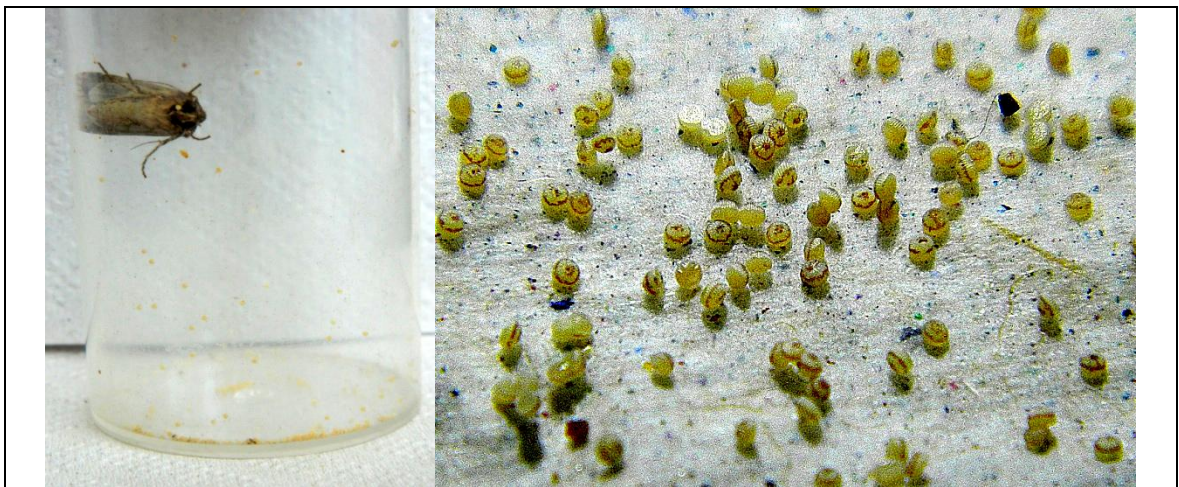


Figura 3. Hembra de *A. bilitura* en recipiente plástico (izquierda) y acercamiento de los huevos colectados en placa Petri (derecha).

Desde la eclosión, las larvas fueron alimentadas con hojas de hortalizas (*Acelga* *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, lechuga *Lactuca sativa*, espinaca *Spinacia oleracea*) libres de plaguicidas químicos. Transcurridos 9 días, las larvas se distribuyeron en recipientes de plástico de 500 mL en grupos de 6 larvas. A los 16 días se pasaron individualmente a frascos de plástico transparente de 100 mL hasta que alcanzaron entre 0,15 - 0,2 g de peso, correspondientes al estado larval L4, según observaciones preliminares, para la realización de los experimentos (Figura 4).

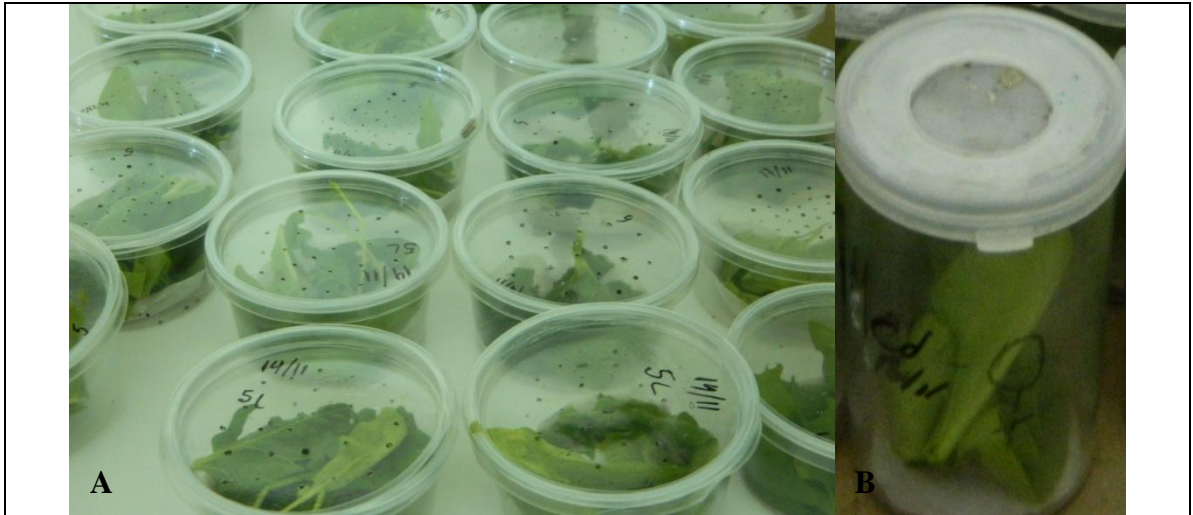


Figura 4. Crianza de *A. bilitura*. (A) Grupo de 6 larvas en recipientes de 500 mL. (B) Frasco con una larva de *A. bilitura*.

Todos los recipientes se mantuvieron en cámaras de crianza a una temperatura de 25 ± 2 °C y fotoperíodo de 16L: 8O (Carrillo *et al.*, 2001).

Suelo

El suelo de textura franca se obtuvo de los primeros 40 cm del perfil (densidad $1,7 \text{ g cm}^{-3}$), perteneciente a la Serie Santiago (CIREN, 1996), del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, comuna de La Pintana, Santiago (Cuadro 1). Para descartar la posible presencia de otros organismos, el suelo se esterilizó exponiéndolo a temperaturas de $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante tres horas.

La humedad del suelo utilizado para cada tratamiento se homogeneizó a capacidad de campo. Para esto, se colocó suelo en contenedores de 10 litros perforados en su base y se regó abundantemente con agua destilada. El exceso de agua se eliminó por drenaje durante 48 horas. Para homogeneizar la temperatura del suelo en los distintos tratamientos, este proceso se realizó dentro de una cámara a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Cuadro 1: Propiedades físicas del suelo utilizado.

Clase textural	Capacidad de retención de agua Volumétrico (%)		Textura (%)			
	CC	PMP	HA	a	A	L
Franco	22	14	8	38,8	20,8	40,4

Capacidad de retención de agua (porcentaje volumétrico de agua en el suelo), capacidad de campo (CC%), punto de marchitez permanente (PMP%) y humedad aprovechable (HA). Distribución de partículas por tamaño (textura), arcilla (A), limo (L), y arena (a). Fuente: CIREN RM (1996).

EXPERIMENTOS

Para determinar el efecto de los aislamientos de NEP sobre la mortalidad de larvas de *A. bilitura* se realizaron dos experimentos de laboratorio, uno en placas Petri y el otro en macetas. Debido a los resultados obtenidos en ambos experimentos, se decidió posteriormente, realizar un tercer experimento en macetas para determinar el efecto del sustrato en el comportamiento de los aislamientos de NEP frente a un hospedero modelo como lo es *G. mellonella*. Las macetas consistieron en tubos de PVC (Policloruro de Vinilo) con el suelo indicado.

En cada tratamiento el número de individuos muertos se contabilizó cada 24 horas a partir de la inoculación por 6 días. Para verificar la muerte de las larvas por el ataque de los NEP, éstas se colocaron individualmente en Trampas White, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, hasta observar la emergencia de IJ, aproximadamente entre 10 a 12 días desde la muerte del hospedero.

Experimento 1. Determinación de la mortalidad de *A. bilitura* con NEP en placa Petri

La arena experimental consistió en una placa Petri estándar (9 x 1,5 cm), la cual se volteó dejando su base arriba.

El establecimiento de concentración para el experimento se realizó a través de ensayos preliminares, en los cuales se aplicaron dosis de 25; 50; 100; 200 IJ en la base de cada placa, exponiendo una larva por placa con cinco repeticiones. Se observó que el aislamiento Licán Ray mostró la misma efectividad sobre *A. bilitura*, al superar el 60% de mortalidad, en las dosis de 100 y 200 IJ por larva, mientras que el aislamiento Chillán 4, fue efectivo en dosis de 200 IJ por larva.

Para el montaje del experimento, en la tapa de la placa se colocó una base de papel filtro, sobre la cual, con una pipeta se aplicó 1 mL de la suspensión del aislamiento de *Steinernema* sp. correspondiente según el tratamiento. Para el tratamiento con el aislamiento Licán Ray se inoculó con 600 IJ mL⁻¹, y para el aislamiento Chillán 4 se inoculó con 1.200 IJ mL⁻¹, según lo establecido anteriormente. Se dejó transcurrir 2 minutos desde la inoculación, antes de agregar las larvas de *A. bilitura* para asegurar la distribución homogénea de la solución.

Debido a los hábitos de canibalismo que presenta la especie hospedera, se debió evitar el contacto entre las larvas, para lo cual se instaló una estructura desmontable de malla de acero galvanizado que formaba 6 divisiones en forma radial dentro de la placa, colocando en cada división sólo una larva del estadio L4 de *A. bilitura* (Figura 5).



Figura 5. Larvas de *A. bilitura* en placa Petri con divisiones de acero galvanizado.

Las placas tapadas se rotularon según tratamiento y repetición, luego se introdujeron en una bandeja de manera aleatoria y se cubrieron con una bolsa plástica para mantener la humedad. Se dejaron en una cámara oscura a 25 ± 2 °C durante todo el ensayo.

Las larvas se revisaron cada 24 horas, hasta que ambos aislamientos causaran la máxima mortalidad, y aquellas que presentaron signos de infección o muerte se colocaron individualmente en Trampas White para verificar la emergencia de los NEP inoculados.

Se consideró como larva muerta aquella que no presentó movimiento ni capacidad de reacción al estímulo de un toque con una aguja.

Experimento 2. Determinación de la mortalidad de *A. bilitura* con NEP en macetas

La arena experimental consistió en un tubo de PVC de 75 mm de diámetro y 30 cm de largo, el cual contaba con una abertura lateral a los 20 cm, para facilitar la extracción de una placa modificada (Figura 6). El tubo de PVC se llenó hasta los 10 cm con suelo de textura franca previamente tratado con calor y llevado a capacidad de campo.

Luego se colocó dentro del tubo una placa Petri de plástico, modificada en ambas caras con malla de acero galvanizado, para permitir el contacto directo de las larvas con el sustrato. Además, éstas tenían 6 divisiones fijas en forma radial en su base, elaboradas con la misma malla. En cada una de las secciones mencionadas se colocó una larva de *A. bilitura* individualmente para evitar el canibalismo. Se procedió al llenado de los 20 cm restantes de los tubos con el mismo suelo (Figura 6).

Enseguida se inoculó cada tubo con el aislamiento de *Steinernema* sp. que correspondía a cada tratamiento. Para esto se aplicó, con la ayuda de una pipeta, 5 mL de una suspensión de agua destilada que contenía 4.400 IJ, en el centro de la abertura superior de cada tubo, dosis adaptada de 1×10^6 IJ m⁻² (Sharma *et al.*, 2011).

Las aberturas de los tubos de PVC se taparon con una bolsa de plástico de alta permeabilidad perforada con un alfiler en su centro, se rotularon según tratamiento y repetición, y se mantuvieron verticalmente en una cámara oscura a 25 ± 2 °C durante todo el ensayo (Figura 6).

Los tratamientos se revisaron cada 24 horas, durante 6 días, sacando las placas Petri del tubo, y aquellas larvas que presentaron signos de infección o muerte, se extrajeron cuidadosamente, colocándolas individualmente en Trampas White para verificar la emergencia de los IJ inoculados. Las larvas que respondían al estímulo de una aguja se dejaron en la misma zona de la placa para su revisión posterior. Se consideró como larva muerta aquella que no presentaba movimiento ni capacidad de reacción al estímulo con una aguja.

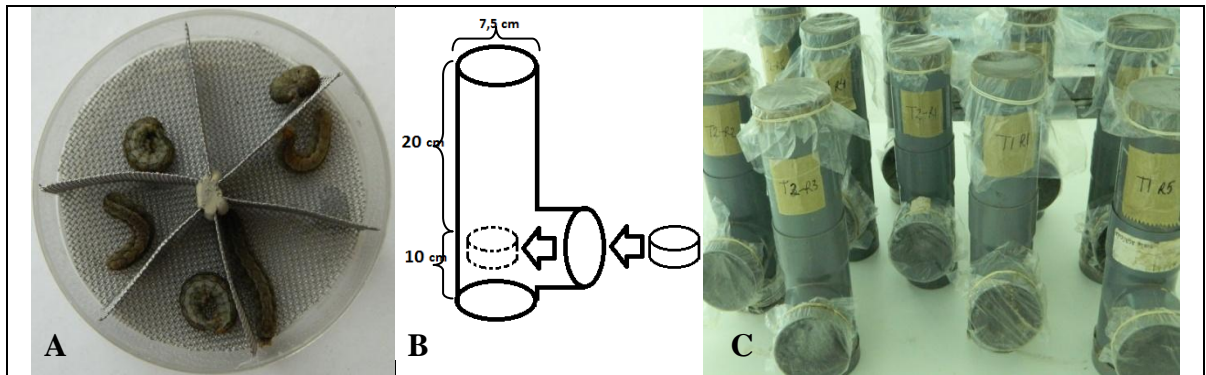


Figura 6. Montaje del experimento N°2. A) Placa Petri modificada con larvas de *A. bilitura*. B) Esquema de la forma en la que se introdujo la placa Petri. C) Tubos de PVC con los respectivos tratamientos en forma aleatoria.

Experimento 3. Determinación de la mortalidad de *G. mellonella* con NEP en macetas

Dado que la mortalidad fue diferente en los experimentos N°1 y N°2, y con el fin de evaluar la capacidad de búsqueda y detección en el suelo de los aislamientos de NEP, en condiciones controladas, y la posible interacción entre el NEP y su hospedero, se procedió a realizar un tercer experimento. Este experimento consistió en una arena experimental con las mismas características del experimento N°2, pero se cambió al hospedero por larvas de *G. mellonella*, siendo ésta la especie modelo que se utiliza de manera estándar en estudios con NEP, las cuales se seleccionaron con un peso similar a las larvas L4 de *A. bilitura* que se utilizaron en el experimento N°1 y N°2.

Dentro de cada tubo se colocó una placa Petri de plástico modificada en ambas caras con malla de acero galvanizado sin divisiones, para permitir el contacto directo de las larvas con el sustrato. En el centro de la placa se ubicaron las 6 larvas de último estadio de *G. mellonella* con suelo. Se procedió al llenado de los 20 cm restantes de los tubos con el mismo suelo (Figura 6), y enseguida se inoculó cada tubo siguiendo el mismo protocolo mencionado en el experimento N°2.

Los tratamientos se revisaron cada 24 horas, durante 6 días, según protocolo mencionado anteriormente.

Diseño experimental

Los experimentos N°1, 2 y 3 consistieron en tres tratamientos, con cinco repeticiones por tratamiento. En todos los casos los tratamientos fueron: Control sin NEP (T_0); Aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp. (T_1); y aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp. (T_2). La unidad experimental correspondió a las 6 larvas del estado L4 de *A. bilitura* (Exp. N°1 y 2) o *G. mellonella* (Exp. 3) por placa o maceta, según corresponda.

Para los tres experimentos se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). Se evaluó la mortalidad causada por el ataque de cada aislamiento de NEP nativo, verificada en la emergencia de NEP desde la Trampa White. La mortalidad se expresó en porcentaje y se evaluó cada 24 horas por 10 días.

Para evaluar las posibles diferencias entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) al 5% de nivel de significancia, utilizando el programa INFOSTAT, para lo que previamente el porcentaje de mortalidad obtenido se normalizó mediante la Transformación Angular de Bliss. Para detectar diferencias significativas entre las medias, se utilizó la prueba de comparación de Tukey al 5%.

Para la evaluación de la influencia de la arena experimental sobre la capacidad infectiva de los NEP en *A. bilitura*, se realizó un análisis factorial de los resultados obtenidos entre los experimentos N°1 y 2. Para detectar diferencias significativas entre las medias, se utilizó la prueba de comparación de Tukey al 5%.

Además se evaluó el tiempo en que los aislamientos de NEP causaron la muerte de las larvas mediante un análisis de la supervivencia de éstas, para lo cual se realizó la curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier, y para evaluar las posibles diferencias entre las curvas de sobrevivencia se utilizó el Test de Long Rank al 5% de nivel de significancia, usando el programa INFOSTAT.

RESULTADOS

Experimento 1. Determinación de la mortalidad de *A. bilitura* con NEP en placa Petri

En el tratamiento testigo (T_0) las larvas permanecieron vivas de 7 a 10 días, desde el inicio del experimento a 25 ± 2 °C, por lo cual no se presentan en el cuadro 2. En la evaluación de mortalidad sólo se consideraron aquellas larvas desde las cuales se verificó emergencia de NEP en las Trampa White.

El primer día de evaluación las larvas se comportaron normalmente, moviéndose en toda la celda y consumiendo pequeñas zonas del papel filtro. Al segundo día, las larvas dejaron de moverse, y las larvas expuestas al aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp. (en adelante T_1) alcanzó una mortalidad acumulada del 50 %, y aquellas expuestas al aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp. (en adelante T_2) sólo alcanzó el 16,7 % en promedio (Cuadro 2). La mortalidad máxima acumulada fue de 90 % en T_1 y 90 % en T_2 , a los días 3 y 6, respectivamente. Las larvas que murieron después de los 6 días de evaluación, no murieron por el ataque de los nematodos, comprobado por las trampas White, ya que no hubo emergencia de NEP desde los cadáveres.

Las larvas infectadas y muertas por ambos aislamientos de NEP presentaron cambio de color, tornándose marrón oscuro, perdieron firmeza, sin disgregarse ni producir olor desagradable, lo que es característico de la muerte por NEP. Por su parte, aquellas que presentaron muerte por otros patógenos presentaron una apariencia viscosa o desarrollo de micelio, junto con olor a descomposición y posteriormente no hubo emergencia de NEP desde las Trampas White (Koppenhöffer, 2007).

Estos resultados indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad final acumulada causada en ambos tratamientos con NEP.

Cuadro 2. Mortalidad promedio acumulada (%) en larvas L4 de *A. bilitura* causada por ambos aislamientos de NEP durante los 6 días de evaluación en placas Petri.

Tratamiento	Mortalidad Acumulada						
	Días después de la inoculación						
	1	2	3	4	5	6	± EE
T_1	0	50	90	90	90	90	± 5
T_2	0	16,7	46,7	56,7	80	90	± 5

Donde los tratamientos son los aislamientos de *Steinernema* sp.: T_1 - Licán Ray; y T_2 - Chillán 4. Se resalta en gris el día en que se alcanzó la máxima mortalidad. EE (Error Estándar) de la mortalidad final acumulada sometida a análisis estadístico.

Ambos aislamientos causaron la muerte de su hospedero y fueron capaces de reproducirse en éste. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad acumulada de los tratamientos, sin embargo, existe una diferencia en el tiempo que los aislamientos causan la muerte del hospedero.

El tiempo de sobrevida de las larvas de *A. bilitura* fue evaluado realizando la curva de Kaplan-Meier, utilizando el Test de Long Rank al 5% de significancia, el cual indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de la supervivencia de las larvas expuestas a los tratamientos T₁ y T₂ ($p = 0,008$). Las larvas expuestas a T₁ presentan una curva de sobrevida que decrece más rápidamente que las expuestas a T₂. En la Figura 7 se puede observar que el 50% de las larvas expuestas a T₁ viven hasta los 2 días, siendo este aislamiento el que causa más rápido la muerte de las larvas, comparado con el T₂ donde el 50% viven aproximadamente 4 días.

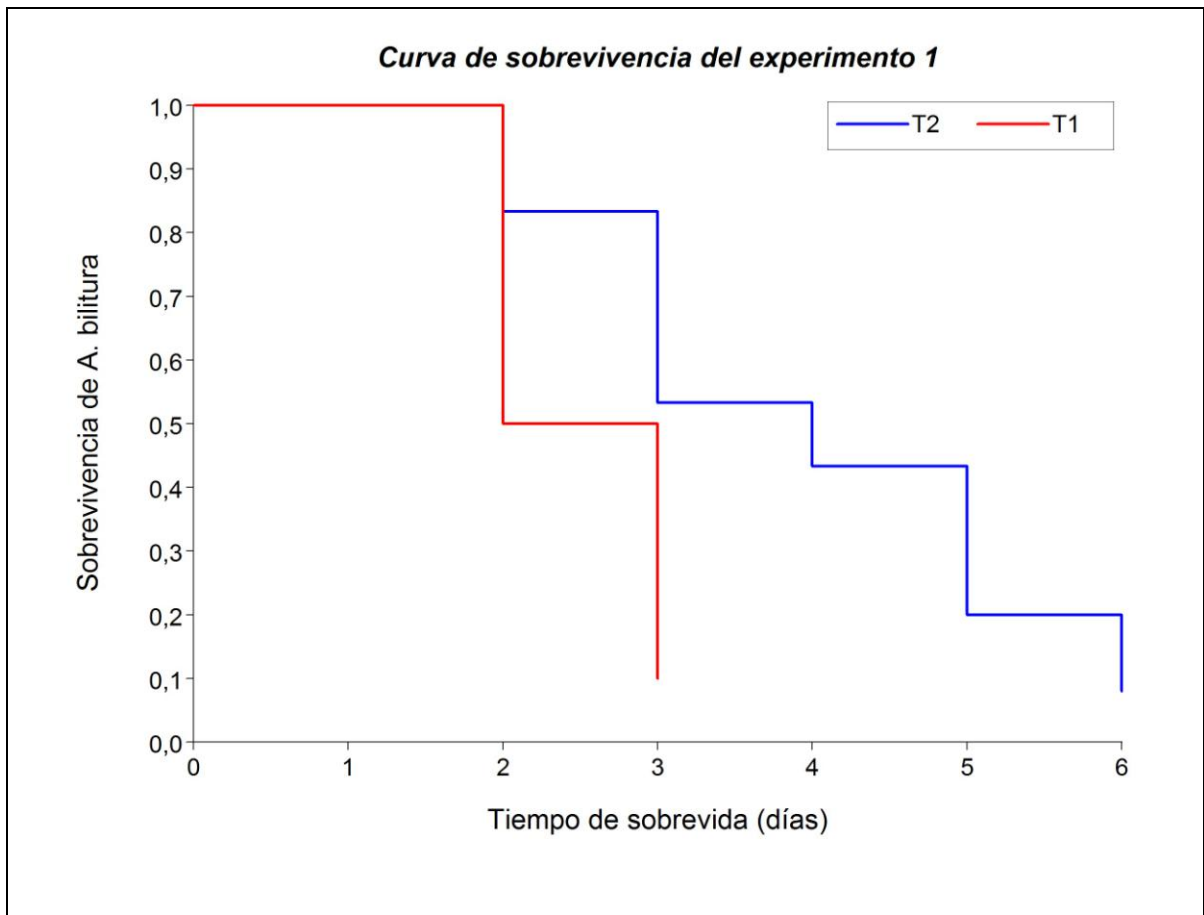


Figura 7. Curva de Kaplan-Meier, donde el 50% de las larvas de *A. bilitura* expuestas a T₁ (Aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp.) viven hasta los 2 días, comparado con el T₂ (Aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp.) donde el 50% viven aproximadamente 4 días.

Experimento 2. Determinación de la mortalidad de *A. bilitura* con NEP en macetas

En el tratamiento testigo (T_0) las larvas permanecieron vivas de 7 a 9 días, desde el inicio del experimento, a 25 ± 2 °C, por lo que no se presentan sus resultados en el Cuadro 3. En la evaluación de mortalidad sólo se consideraron aquellas larvas desde las cuales se verificó emergencia de NEP en las Trampa White. En este ensayo se observó una mortalidad acumulada promedio al día 6 del 83,3 % en larvas expuestas al aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp. (en adelante T_2), y del 36,7 % en las larvas expuesta al aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp. (en adelante T_1).

En los dos primeros días de evaluación, se observó que las larvas se mantuvieron quietas en la placa modificada, y al ser perturbadas éstas se movían normalmente. Al día 3 se observó en T_1 una mortalidad acumulada de 16,7%, en comparación con T_2 , donde se observó 29,2% (Cuadro 3).

En los tratamientos T_1 y T_2 la mortalidad causada por los NEP después del sexto día no aumentó, y en aquellas larvas que murieron después de este período no se registró emergencia de NEP desde las Trampas White.

Las larvas muertas por ambos aislamientos de NEP, o por el ataque de otros patógenos presentaron los mismos síntomas descritos en el experimento anterior.

Cuadro 3. Mortalidad promedio acumulada (%) en larvas L4 de *A. bilitura* causada por ambos aislamientos de NEP durante los 6 días de evaluación en macetas.

Tratamiento	Mortalidad Acumulada						
	Días después de la inoculación						
	1	2	3	4	5	6	±EE
T_1	0	0	16,7	23,3	36,7	36,7	±10 b
T_2	0	0	29,2	62,5	75	83,3	±10 a

Promedios dentro de la columna seguida con una letra diferente son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Tukey. Se resalta en gris el día en que se alcanzó la máxima mortalidad. EE (Error Estándar) de la mortalidad final acumulada sometida a análisis estadístico. Donde los tratamientos son los aislamientos de *Steinernema* sp.: T_1 - Licán Ray; y T_2 - Chillán 4.

En esta arena experimental, los NEP de ambos aislamientos fueron capaces de encontrar a su hospedero a 20 cm de profundidad desde el punto de inoculación, causar la muerte y reproducirse en éste. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, donde se observa que T_2 fue más efectivo en cuanto a la mortalidad alcanzada, superando al T_1 , además existe una diferencia en el tiempo en que cada aislamiento causa la muerte del hospedero.

El tiempo de sobrevida de las larvas de *A. bilitura* fue evaluado realizando la curva de Kaplan-Meier, el cual indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de la supervivencia de las larvas expuestas a T₁ y T₂ ($p = 0,0094$). Las larvas expuestas a T₂ presentan una curva de sobrevida que decrece más rápidamente que las expuestas a T₁. En la Figura 8 se puede observar que el 50% de las larvas expuestas a T₂ viven hasta los 4 días aproximadamente, siendo este tratamiento el que causa más rápido la muerte de las larvas.

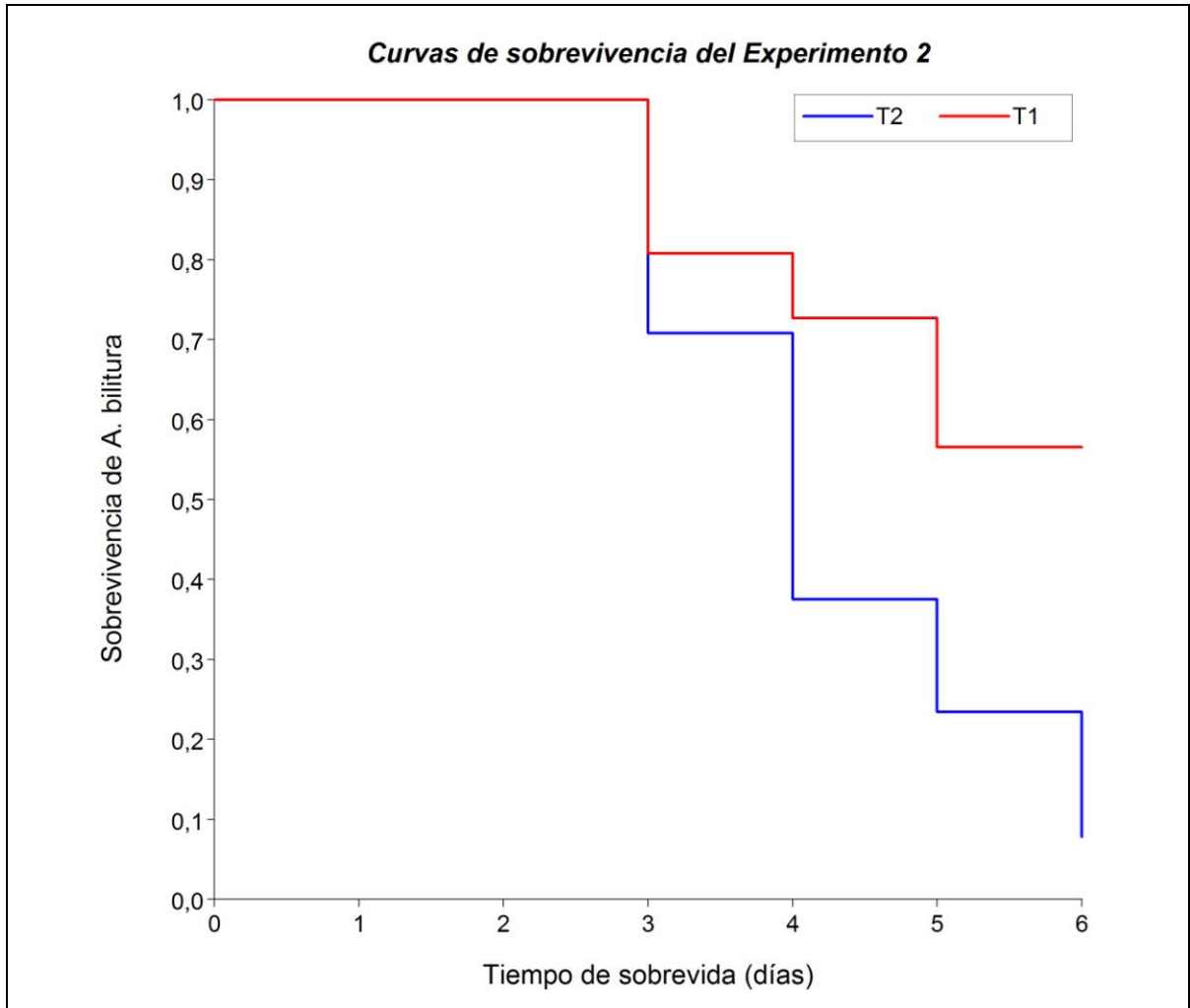


Figura 8. Curva de Kaplan-Meier, donde el 50% de las larvas expuestas a T₂ (Aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp.) viven hasta los 4 días aproximadamente, siendo este tratamiento el que causa más rápido la muerte de las larvas de *A. bilitura* en macetas, comparado con T₁ (Aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp.) el cual no superó el 40% durante los días evaluados.

Debido a los resultados obtenidos anteriormente, donde se ve una diferencia en el comportamiento y en la mortalidad causada por los aislamientos en las diferentes arenas experimentales, se realizó un análisis factorial de los resultados obtenidos entre los experimentos N°1 y 2, para evaluar la influencia de la arena experimental sobre los NEP que determina la mortalidad, cuyo resultado se presenta en el Cuadro 4, con su respectivo error estándar (EE).

Cuadro 4. Resumen del análisis factorial entre los experimentos N°1 y 2.

	NEP	Arena	Mortalidad (%)	EE	
T₁	Licán Ray	Placa Petri	90	±8	a*
T₂	Chillán 4	Placa Petri	90	±8	a
T₂	Chillán 4	Maceta	83,3	±8	a
T₁	Licán Ray	Maceta	36,7	±8	b
T₀	Sin NEP	Placa Petri	0	±8	c
T₀	Sin NEP	Maceta	0	±8	c

*Promedios dentro de la columna seguida con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según Prueba de Tukey.

El análisis factorial indica que existe una influencia del sustrato sobre la efectividad del aislamiento de NEP; la interacción NEP x Arena resultó con un valor para $p = 0,0151$, lo que explicaría la diferencia en mortalidad. Esto se debería, entre otros factores que serán explicados en la discusión, a la distancia que deben recorrer los nematodos para llegar a su hospedero. Además, en esta arena experimental se observó que el mejor tratamiento fue el realizado con el aislamiento Chillán 4 con una mortalidad de 83,3 %.

Experimento 3. Determinación de la mortalidad de *G. mellonella* con NEP en macetas

Al igual que en los experimentos N°1 y N°2, el tratamiento testigo (T_0) las larvas permanecieron vivas de 7 a 8 días, desde el inicio del experimento, a 25 ± 2 °C, por lo que no se presentan sus resultados en el Cuadro 5. En la evaluación de mortalidad sólo se consideraron aquellas larvas desde las cuales se verificó emergencia de NEP en las Trampa White.

En el primer día de evaluación se observó una disminución considerable del movimiento de las larvas y formación de seda. Al tercer día se observó en larvas expuestas al aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp. (en adelante T_1) una mortalidad acumulada de 23,3 %, en comparación con las larvas expuestas al aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp. (en adelante T_2) el cual mostró una mortalidad mayor de 46,7 % (Cuadro 5). La mortalidad máxima para el T_1 se alcanzó al sexto día siendo de 66,7 %, mientras que para el T_2 fue al cuarto día con 60 %, sin embargo, estos resultados no fueron significativamente diferentes.

En ambos tratamientos la mortalidad causada por los NEP produjo los síntomas descritos en los experimentos anteriores. Aquellas larvas que murieron después del sexto día no registraron emergencia de NEP desde las Trampas White.

Cuadro 5. Mortalidad promedio acumulada (%) en larvas L4 de *G. mellonella* causada por ambos aislamientos de NEP durante los 6 días de evaluación en macetas.

Tratamiento	Mortalidad Acumulada						
	Días después de la inoculación						
	1	2	3	4	5	6	±EE
T_1	0	0	23,3	50	60	66,7	±8
T_2	0	0	46,7	60	60	60	±8

Donde los tratamientos son los aislamientos de *Steinernema* sp.: T_1 - Licán Ray; y T_2 - Chillán 4. Se resalta en gris el día en que se alcanzó la máxima mortalidad. EE (Error Estándar) de la mortalidad final acumulada sometida a análisis estadístico.

Ambos aislamientos de NEP fueron capaces de encontrar a su hospedero, causar la muerte y reproducirse en *G. mellonella* en macetas con suelo, en comparación con el T_0 donde no se registró mortalidad durante el periodo de evaluación. Al igual que en los experimentos anteriores, el tiempo de sobrevivencia de las larvas fue evaluado realizando la curva de Kaplan-Meier, el cual indicó que no hay diferencias entre los tratamientos (Figura 9).

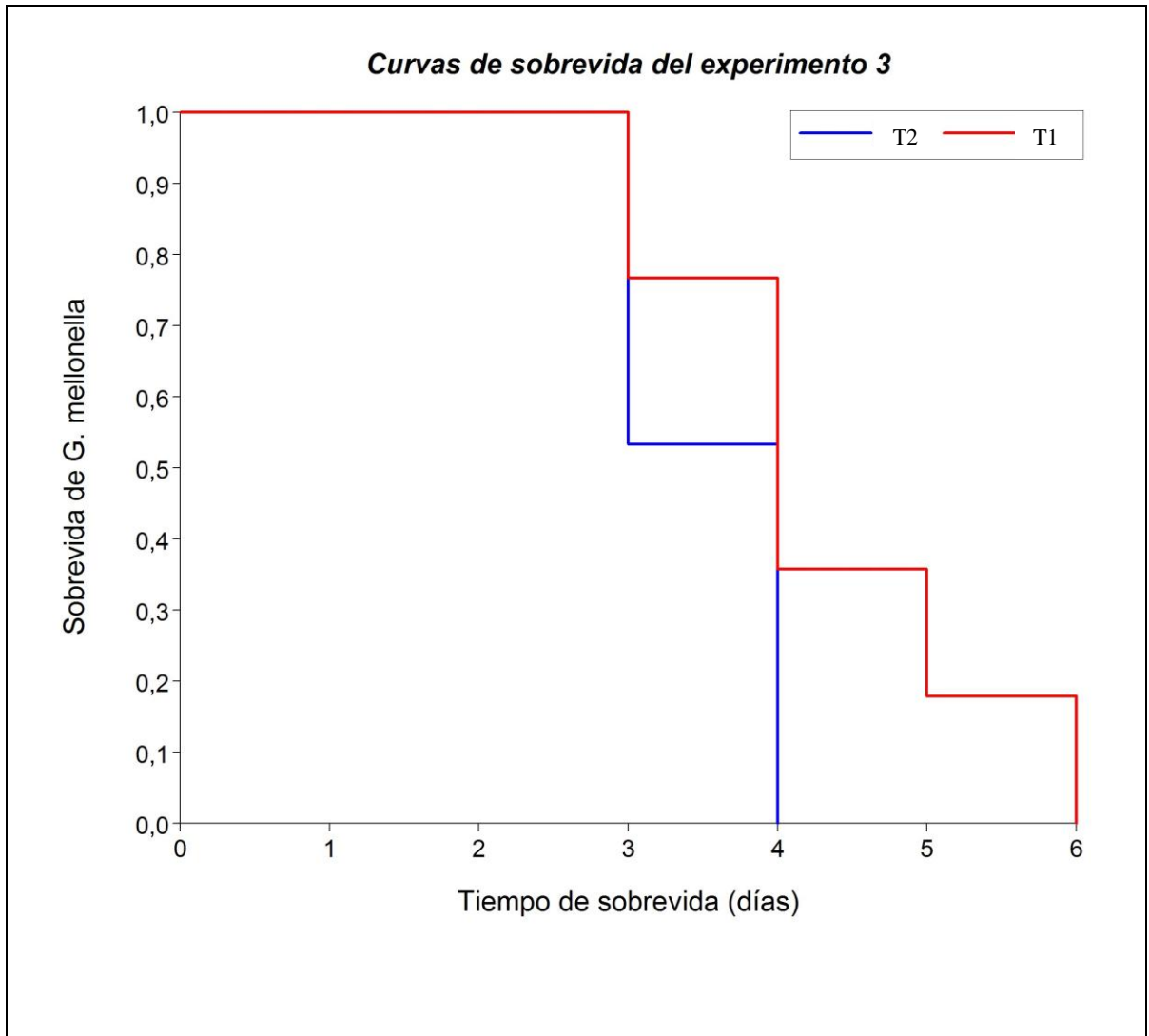


Figura 9. Curva de Kaplan-Meier, donde el 50% de las larvas de *G. mellonella* expuestas a T₂ (Aislamiento Chillán 4 de *Steinernema* sp.) como a T₁ (Aislamiento Licán Ray de *Steinernema* sp.) viven entre 3 a 4 días. No existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

DISCUSIÓN

Existe mucho interés en aislar y caracterizar nuevos nematodos entomopatógenos nativos desde los distintos ecosistemas, ya que estos estarían mejor adaptados a las condiciones ambientales y presentarían un alto potencial para ser usados como controladores biológicos, pero esto se ve dificultado por las interacciones entre el nematodo y su hospedero, y a la vez la interacción de éstos con el ambiente (Hazir *et al.*, 2003).

En base a los resultados obtenidos, ambos aislamientos nativos de *Steinernema* sp. evaluados son capaces de desplazarse en suelo de textura franca, penetrando y causando mortalidad en larvas L4 de *A. bilitura*, además de reproducirse en el hospedero, generando más IJ que pueden colonizar nuevos hospederos. Esto coincide con lo reportado por Vidal (2014), quien estudió el desplazamiento de NEP del aislamiento Licán Ray en suelos de distintas texturas, concluyendo que el suelo ideal para este NEP es el de textura franca. En el presente estudio se observó que Licán Ray es capaz de moverse verticalmente distancias de 20 cm causando la muerte del hospedero a los 3 días post aplicación.

En el experimento N°1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad final de *A. bilitura* causada por ambos aislamientos de NEP, cercana al 90% sin embargo se observó una diferencia estadísticamente significativa en la velocidad en que éstos causaron la muerte de su hospedero. La alta capacidad de estos NEP para causar la muerte del hospedero en placas Petri puede deberse a la influencia del medio en el comportamiento de los nematodos, ya que en esta arena experimental se iguala la capacidad de forrajeo de ambos aislamientos al quedar directamente en contacto con el hospedero, y por lo tanto se eliminan factores como la necesidad de captar la concentración de CO₂ para localizar a su hospedero, o la distancia que debe recorrer este microorganismo en el suelo. Además se reduce la influencia de otros organismos patógenos y competidores tanto para el insecto como para los NEP (Lewis *et al.*, 1993).

En placas Petri, la diferencia en la velocidad con que cada aislamiento causa la muerte de su hospedero puede deberse al tiempo que demora el NEP en penetrar la cutícula de su hospedero y cambiar de fase no infectiva a infectiva, el cual influye en la liberación de la bacteria simbiote (Wang *et al.*, 1995; Gungor *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Alvarado, 2012). A su vez estas bacterias deben superar el sistema de defensa del hospedero, (Li *et al.*, 2007), ya que se producen hemocitos granulares encargados de melanizar las bacterias liberadas por los NEP. Un estudio realizado en larvas de *Tipula oleracea* L. (Diptera: Tipulidae) mostró además la capacidad de estos hemocitos de melanizar los IJ de *Heterorhabditis megidis*, lo que se expresaría como una mayor o menor susceptibilidad a un aislamiento de NEP, y explicaría las diferencias en tiempo y porcentaje de mortalidad alcanzada con diferentes aislamientos en un mismo hospedero (Peters *et al.*, 1997). Esta respuesta inmune estaría moderada por la identificación de proteínas en la cubierta del nematodo el cual activaría el sistema de defensa del hospedero, lo que varía dependiendo

de las especie y aislamiento de NEP (Li et al., 2009). Estos resultados se conciden con los obtenidos en otra investigación realizada en Estados Unidos bajo condiciones controladas de laboratorio realizado en *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lepidóptera: Noctuidae) en el cual se utilizó *S. feltiae*, aislamientos Mexican y Kapow, en placas Petri, los cuales registraron una mortalidad similar al obtenido en este estudio, alcanzando el 96 y 100% respectivamente, a los 5 días post inoculación (Capinera et al., 1988).

La diferencia en la mortalidad alcanzada entre los dos aislamientos en el experimento N°2, pueden ser atribuida a diferentes factores, entre ellas el grado de movilidad del aislamiento de NEP. Según Lewis et al., (1993), en un mismo sustrato algunos aislamientos son más móviles que otros. También puede influir la temperatura a la que se encuentran, siendo en su mayoría inactivos a temperaturas inferiores a 10 °C. Otro factor importante es su capacidad para detectar los gradientes en las concentraciones de CO₂, lo que se debe a que algunos nematodos son más sensibles a captar las sustancias volátiles emitidas por el hospedero (Lezama et al., 2006). Un estudio realizado por Alvarado (2012), sobre el aislamiento Licán Ray de *Steirnermema* sp. corrobora este comportamiento, el cual indica que éste es más efectivo a temperaturas superiores a 15 °C, y no infectivo a temperaturas inferiores a 10 °C, lo que podría explicar la menor mortalidad causada en suelo comparando con el aislado Chillán 4, sin embargo no hay estudios previos realizados sobre el comportamiento de este último que permitan concluir el efecto de la temperatura sobre la mortalidad del experimento N°2.

Otro factor importante es la presencia de un sustrato el cual pone a prueba las estrategias de búsqueda de los aislamientos para encontrar a su hospedero (Campbell y Gaugler, 1993). Por ejemplo, *Steirnermema feltiae* es catalogado de comportamiento mixto, ya que tiene un periodo de emboscada en el que espera a su hospedero cerca de la superficie, pero también es capaz de ir en busca de éstos (Grewal et al., 1994b). Así mismo, Rozas (2009) reporta el comportamiento de búsqueda de dos especies diferentes de Steinernematidae, donde por ejemplo, *Steirnermema australe* (aislamiento Qu-N3), fue de persecución con periodos de nictación, mientras que *Steirnermema diaprepesi* (aislamiento Qu-N5) fue sólo de persecución. De acuerdo a esto se podría pensar que el aislamiento Chillán 4 presenta un hábito de búsqueda más efectivo que el aislamiento Licán Ray.

Otro factor muy relevante es la relación NEP con su hospedero, donde se ha visto que los nematodos prefieren a ciertos insectos por sobre otros. Según estudios realizados por Grewal et al., (1993), luego de superar los obstáculos para encontrar a su hospedero, los nemátodos realizan un reconocimiento de éste a través del contacto directo con su cutícula y excreciones para reconocer si es posible la reproducción dentro de éste o si ya ha sido parasitado por otros nematodos o parasitoides. Esto podría explicar la diferencia en las mortalidades alcanzadas por los distintos aislamientos, donde Chillán 4 se vería más atraído por *A. bilitura* que el aislamiento Licán Ray, detectando más rápido las señales químicas y siendo más compatible con el hospedero, resultando en una mayor mortalidad.

La existencia de un sustrato y ausencia de alimento también afecta la susceptibilidad del hospedero al aislamiento de NEP, ya que en esta arena el insecto se ve sometido a las

condiciones que generan un estado de reposo, disminuyendo su movilidad y metabolismo, lo que puede incidir en el comportamiento del aislamiento. Se ha visto que algunos nematodos prefieren ingresar por las aperturas naturales como la boca al alimentarse el insecto, y no a través de la cutícula, los cuales estarían más restringidos en un hospedero no activo. Lo anterior podría explicar el comportamiento del aislamiento Licán Ray, el cual no pudo superar el 50% de mortalidad en esta arena. Esto ha sido reportado por Zaki (1996), quién indica una reducción del 100% en el daño causado por *A. ipsilon* en un cultivo de Okra tratado con formulaciones de cebos con *Steinernema feltiae*, ya que al alimentarse de este, los IJ de *Steinernema* sp. ingresan por las aberturas naturales, especialmente la boca, lo cual no ocurriría en hospederos en inactividad (Poinar, 1986; Melo *et al.*, 2007; Lewis y Clarke, 2012).

Estos aislamientos han sido evaluados previamente en el insecto huésped *G. mellonella* en condiciones similares (Vidal, 2014; Allende, 2015), sin embargo, esta es la primera evaluación que se realiza sobre su capacidad como controladores biológicos de plagas específicas que habitan el suelo y por primera vez se reporta mortalidad superior al 80% en gusanos cortadores en Chile. Un resultado similar fue descrito por Capinera *et al.*, (1988) en *A. ipsilon* en Estados Unidos, en un ensayo realizado con suelo en condiciones de laboratorio, donde se alcanzó un 70% de mortalidad a los 7 días post inoculación. En Chile, se pueden mencionar el estudio realizado por INIA entre el 2000 y el 2004, donde se evaluó en condiciones de laboratorio, el aislamiento nativo Qu-N820 (*Steinernema* sp.) en dosis similares a las utilizadas en este estudio, y se observó una alta habilidad parasítica y capacidad del NEP de moverse a diferentes profundidades de suelo para alcanzar larvas de la familia Curculionidae como *Aegorhinus superciliosus*, *Otiorhynchus sulcatus* y *Asynonychus cervinus* (FIA, 2011). También se ha evaluado el aislamiento nativo Qu-N3 de *Steinernema australe* en sustrato de aserrín de *Nothofagus* sp. y suelo, reportando 95% de mortalidad sobre el hospedero *Dalaca pallens* Blanch. (Lepidóptera: Hepialidae) en condiciones de laboratorio (Maldonado, 2009) y 100% sobre *Aegorhinus superciliosus* (Rozas, 2009), lo que indicaría la capacidad de los aislamientos nativos de Chile de la especie *Steinernema* sp. para causar mortalidad en otras plagas del suelo, y su alto potencial para ser utilizados en el manejo biológico de plagas.

El experimento N°3 no reportó diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad causada por los aislamientos evaluados, pero se pudo apreciar una mayor velocidad del aislamiento Chillán 4 en causar la muerte de *G. mellonella*, matando al 50% de las larvas al cabo de 4 días, lo cual también se observó en el experimento N°2 con *A. bilitura*. Sin embargo el aislamiento Licán Ray causó una mayor mortalidad en *G. mellonella* en el experimento N°3 (66,7 %), comparada con la causada en *A. bilitura* en el experimento N°2 (36,7 %). Como ha sido mencionado anteriormente, esto puede deberse a la habilidad de búsqueda del aislamiento Chillán 4, atribuyéndole mayor eficiencia en la localización de hospederos que viven a mayor profundidad y de poca movilidad, mientras que la diferencia en la mortalidad causada por aislamiento Licán Ray, indicarían la relación entre el aislamiento del NEP y la especie hospedera que determinarían la mortalidad. Esta relación se ha informado en los estudios realizados por INIA, donde se utilizaron como

hospederos diferentes especies de Curculiónidos y se probó diferentes aislamientos de NEP nativos, mostrando que existe una especificidad de cada NEP por cada especie hospedera (France, 2013). Por ende, la rapidez y capacidad para causar la muerte del hospedero no sería únicamente influenciada por un incremento de la dosis recomendada, como se demuestra en estudios anteriores en los que se ha visto que la aplicación de concentraciones superiores a 40.416 IJ del aislamiento Licán Ray sobre larvas de *G. mellonella* no incrementa significativamente la mortalidad (Alvarado, 2012). Esto indicaría que formulaciones con dosis mayores no serían justificadas para obtener mortalidades mayores en este hospedero, y que es necesario conocer las interacciones NEP-hospedero.

En consecuencia, el uso de aislamientos nativos de NEP es efectivo para el control de esta plaga del suelo, presentando las ventajas propias de utilizar un controlador biológico, además de la capacidad de los NEP para buscar, matar y reproducirse dentro de sus hospederos, y siendo compatibles con la utilización de algunos productos químicos. Debido a que en Chile aún no se conoce mucho sobre su uso, existe poca inversión en tecnologías de multiplicación de NEP para su venta como producto biológico. Sin embargo, según Kaya (1986), la tecnología actual permite que el costo de la aplicación y reproducción de los nematodos no sea un factor limitante, comparado con los costos económicos y ambientales de los plaguicidas químicos.

Finalmente, es fundamental evaluar la acción de los aislamientos Licán Ray y Chillán 4 sobre hospederos en condiciones de campo, ya que como se observó en los experimentos N°1 y 2, realizar ensayos en un sólo sustrato no asegura la efectividad en campo. Por estas razones se sugiere realizar más investigación asociada al uso de estos controladores y su influencia indirecta sobre el rendimiento de los cultivos en zonas afectadas por plagas del suelo, como *A. bilitura*. Esta información permitirá establecer dosis, concentraciones de NEP, frecuencia y período de aplicación, para obtener un producto comercial disponible para el uso de los productores.

CONCLUSIONES

En relación a los resultados expuestos en el presente informe se puede concluir lo siguiente.

- En condiciones de laboratorio, los aislamientos de nematodos entomopatógenos nativos “Licán Ray” y “Chillán 4” del género *Steinernema* causan mortalidad sobre larvas L4 de *Agrotis bilitura*.
- Los aislamientos utilizados son capaces de reproducirse en larvas de *A. bilitura*, causando su muerte entre 3 a 6 días desde la aplicación de NEP en suelo de textura franca.
- Los aislamientos de NEP utilizados no se comportan de igual forma en placa Petri como en suelo con textura franca debido a sus diferentes hábitos de búsqueda.
- Los aislamientos de NEP utilizados no son igualmente efectivos en la búsqueda de *A. bilitura* y de *G. mellonella* debido a la interacción entre NEP-Hospedero el cual determina la mortalidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Alekseev, E.; I. Glazer and M. Samish. 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. *BioControl*, 51(4): 507-518.
- Allende, G. 2015. Efecto 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 Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 28 h.
- Alvarado, A. 2012. Hábitos parasitarios y comportamiento de un aislamiento nativo del nematodo entomopatógeno *Steinernema* sp. en larvas de *Galleria mellonella* L. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de ciencias agronómicas, Universidad de Chile. 39 h.
- Alves, S. B. 1998. Patología e controle microbiano: vantagens e desvantagens. *Controle Microbiano de Insetos*, 2: 21-37.
- Artigas, J. 1994. Entomología económica: Insectos de interés agrícola, forestal, médica y veterinarios (nativos, introducidos y susceptibles a ser introducidos); Vol. II. Primera Edición. Concepción, Chile: Aníbal Pinto S.A. 943p.
- Badii, M. H. y S. Varela. 2015. Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. En: Cultura científica y tecnológica. Toxicología de insecticidas. 28(5): 13.
- Barrios, J. 2010. Eficacia de las mezclas de Thiametoxam + Chlorantraniliprole y Thiametoxam + Teflutrin sobre el control de gusanos cortadores en maíz de grano en condiciones controladas y de campo. Memoria Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile: Facultad de ciencias agrarias, Universidad de Talca. 40 h.
- Bisset, J; M. Rodríguez; C. Díaz y L. Alain. 1999. Caracterización de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del Estado de Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(2): 89-94.
- Burnell, A. and S. Stock. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1): 31-42.
- Campbell, J. and R. Gaugler. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour*, 126(3): 155-169.

Campbell, J.; E. Lewis; S. Stock; S. Nadler and H. Kaya. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 35(2): 142-145.

Capinera J.L.; D. Pelissier; G.S. Menout and N.D. Epsky. 1988. Control of black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), with entomogenous nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(3): 427-435.

Carrero, J. M. y S. Planes. 2007. Plagas del Campo. 13° edición. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 775p.

Carrillo, R.; C. Cornejo; M. Neira; O. Balocchi; N. Mundaca y E. Cisternas. 2001. Larvas de noctuidos en praderas permanentes en Valdivia, Chile, durante el periodo invernal. *Agro sur*, 29(1): 27-31.

CIREN (Centro de Información Recursos Naturales), Chile. 1996. Estudio agrológico Región Metropolitana, descripciones de suelos materiales y símbolos. Santiago, Chile: CIREN. 425p.

Devine, G.J. and M.J. Furlong. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*, 24(3): 281-306.

Ebssa, L. and A.M. Koppenhöfer. 2012. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. *Pest management science*, 68(6): 947-957.

Ehler L.E. 1990. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. *Entomopathogenic nematodes in biological control*, 1-19.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. Agricultura orgánica y biodiversidad. Recuperado en: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4137s/y4137s06.htm#bm06>>. Consultado el: 21 de septiembre de 2013.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria), Chile. 2011. Resultados y Lecciones en Biocontrol del Cabrito de los Frutales con Nemátodos Entomopatógenos. Proyectos de Innovación en las Regiones del Biobío, de La Araucanía, de Los Ríos y de Los Lagos. 28p. ISBN N° 978-956-328-107-1.

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

France, A. 2013. Uso de nemátodos entomopatógenos para el control de insectos. (Cap. 3, pp. 35-47). En: Luppichini, P.; A. France; I. Urtubia; N. Olivares y F. Rodríguez. Manejo del Burruto de la vid, *Naupactus xanthographus* (Germar) y otros curculiónidos asociados a vides. Boletín N°260. Chillán, Chile: INIA. 79p.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control: Formulation and application technology. 173-191.

González, R. 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 310p.

Grewal, P.S.; R. Gaugler, and J.F. Campbell. 1994b. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108: 207-215.

Grewal, P.S.; R. Gaugler, and E.E. Lewis. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents. *Journal of Parasitology*, 79: 495-503.

Grewal, P.S.; S. Selvan and R. Gaugler. 1994a. 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. In: P. Grewal, R.-U. Ehlers and D. Shapiro-Ilan (Eds.). Nematode as Biocontrol Agents. CABI Publishing. Wallingford, U.K. 47 - 59.

Gungor, D.S.; N. Keskin and S. Hazir. 2006. Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of invertebrate pathology*, 92(1): 39-44.

Hazir, S.; H.K. Kaya; S.P. Stock and N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27(4): 181-202.

Kaya, H.K. 1986. *Steinernema feltiae*: use against foliage feeding insects and effect on nontarget insects. 268 - 270. in: R. A. Sampson, J. M. Ulak, and D. Peters (Eds), Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology. Wageningen, The Netherlands.

Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. In: L. Lacey (Ed.). Biological techniques: Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. California, U.S.A. 281-324.

Koppenhöfer, A.M.; H.K. Kaya and S.P. Taormino. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal Invertebrate Pathology*, 65(2): 193-199.

Koppenhöfer, A.M. and E.M. Fuzy. 2007. Nematodes for white grub control. Rutgers University, New Brunswick, New Jersey.

Lewis, E.E.; J. Campbell; C. Griffin; H. Kaya and A. Peters. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38(1): 66-79.

Lewis, E.E. and D. Clarke, 2012. Nematode Parasite and Entomopathogens. Pp. 395-426, in: F. Vega and H. Kaya. *Insect Pathology*, 2 nd Ed. Academic Press, CA, U.S.A. 508p.

Lewis, E.E.; R. Gaugler and R. Harrison. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology*, 71(4): 765-769.

Lezama, R.; J. Molina; A. Pescador; E. Galindo and C. Ángel. 2006. Efficacy of Steinernematidae Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on the Suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures: Laboratory and field trials. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 23(1): 41-49.

Li, X.Y.; R.S. Cowles; E.A. Cowles; R. Gaugler and D.L. Cox-Foster. 2007. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *International Journal for Parasitology*, 37(3): 365-374.

Li, X.Y.; E.A. Cowles; R.S. Cowles; R. Gaugler and D.L. Cox-Foster. 2009. Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165(2): 162-169.

Maldonado, A. 2009. Selección de aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos para el control de *Dalaca pallens* (Lepidoptera: Hepialidae). [En línea]. Memoria Ingeniero Agrónomo. Concepción, Chile: Facultad de agronomía, Universidad de Concepción. 29 p. Recuperado en: http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/maldonado_a/doc/maldonado_a.pdf > Consultado el: 22 de septiembre de 2013.

Melo, E; C. Ortega y A. Gaigl. 2007. The effect of nematodes on larvae of *Phyllophaga menetriesi* and *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(1): 21-26.

Merino, L. y A. France. 2009. Nematodos Entomopatógenos: Control Biológico de Insectos Plaga de Importancia Económica. INIA Tierra Adentro. Informativo N° 35946. 24 - 25p.

MMA (Ministerio del Medio Ambiente), Gobierno de Chile. 2011. Informe del estado del medio ambiente: Agotamiento de la Capa de Ozono. Capítulo 12. 467 – 481p. Recuperado en: <http://www.mma.gob.cl/1304/articles-52016_Capitulo_12.pdf> Consultado el: 20 de septiembre de 2013.

ODEPA (Oficina de estudios y políticas agrarias). [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en:<<http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/>>. Consultado el: 10 de Mayo de 2017.

Peters, A.; D.H. Gouge; R.U. Ehlers and N.G.M. Hague. 1997. Avoidance of encapsulation by *Heterorhabditis* spp. infecting larvae of *Tipula oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(2): 161-164.

Poinar, G. 1986. Entomophagous nematodes. 95 - 122p. In: J.M. Franz (Ed.), Biological Plant and Health Protection. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Rodríguez, D; M. Torres; L. Uribe; L. Flores. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga eleanans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 171-182. [En línea]. Disponible en <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43613279003>>. Consultado el: 22 de septiembre de 2013.

Rozas, I. 2009. Nemátodos entomopatógenos nativos para el control de *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). [En línea]. Memoria Ingeniero Agrónomo. Concepción, Chile: Facultad de agronomía, Universidad de Concepción. 28p. Recuperado en: <http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/rozas_i/doc/rozas_i.pdf>. Consultado el: 14 de septiembre de 2014.

SAG (Servicio agrícola y ganadero). [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en:<http://www.sag.cl/sites/default/files/listado_plagas_cuarentenarias.xls>. Consultado el: 9 de diciembre de 2015.

SAG (Servicio agrícola y ganadero). [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en:<<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/evaluacion-y-autorizacion-de-plaguicidas/1367/registros>>. Consultado el: 10 de Mayo de 2017.

Sánchez, L. y M. Rodríguez. 2008. Potencialidades de *Heterorhabditis bacteriophora* poinar cepa HC1 para el manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. II. Compatibilidad con *Beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin y endosulfan. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2): 104-111.

Shapiro-Ilan, D.I.; R. Han and C. Dolinski. 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology*, 44(2): 226-235.

- Sharma M.P.; A.N. Sharma and S.S. Hussaini. 2011. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialization status - a mini review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(9): 855-870.
- Torrado, A. 2006. Uso de Plaguicidas y Exigencias del Mercado Agroalimentario. En memorias II Curso Internacional de Riesgos Fitosanitarios para la Agricultura Colombiana. Ministerio de Agricultura, CIAT, ICA. Bogotá, Colombia. 5p.
- Urtubia, I.; A. France, y E. Cisterna. 2015. Nemátodos entomopatógenos (NEPs): Microorganismos para el control biológico de insectos plaga. N°129. INIA Quilamapu.
- Vidal, G. 2014. Efecto de la textura del suelo sobre la capacidad de desplazamiento e infectividad en laboratorio de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray. Tesis Magister en Ciencias Agropecuarias. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 49h.
- Wang, Y.; J.F. Campbell and R. Gaugler. 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(2): 178-184.
- Zaki, F.N. 1996. Field application of *Steinernema feltiae* in the form of baits against the greasy cutworm *Agrotis ipsilon* in an Okra field in Egypt. *Anzeiger für Schädlingskunde*, 69(4): 79-80. ISSN 0340-7330.