



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

**EFFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE LA CAPACIDAD DE  
DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD EN LABORATORIO DE  
*Steinernema* sp. AISLAMIENTO LICÁN RAY**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y Grado de  
Magister en Ciencias Agropecuarias Mención, Sanidad Vegetal

**GISELLE CAROLINA VIDAL RETES**

Directores De Tesis  
ERWIN ABALLAY ESPINOZA  
GABRIELA LANKIN VEGA

Profesores consejeros  
JAIME ARAYA CLÉRICUS  
OSCAR SEGUEL SEGUEL

SANTIAGO, CHILE  
2014

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

**EFFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE LA CAPACIDAD DE  
DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD EN LABORATORIO DE  
*Steinernema* sp. AISLAMIENTO LICÁN RAY**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal

**GISELLE CAROLINA VIDAL RETES**

Calificaciones

Calificaciones  
(Memoria de título)

(Tesis de Grado)

**DIRECTORES DE TESIS**

Srta. Gabriela Lankin Vega  
Ingeniero Agrónomo,MS. PhD.

Sr. Erwin Aballay Espinoza  
Ingeniero Agrónomo,PhD.

**PROFESORES CONSEJEROS**

Sr. Jaime Araya Cléricus  
Ingeniero Agrónomo,MS. PhD.

Sr. Oscar Seguel Seguel  
Ingeniero Agrónomo,MS.

Santiago, Chile  
2014

## CAPÍTULO I: EFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE EL DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

### Nemátodos entomopatógenos (NEP)

La continua aplicación de insecticidas en la agricultura ha provocado numerosos problemas, como el desarrollo de resistencia de parte de los insectos, contaminación del agua y eliminación de enemigos naturales. A partir de esto, se ha generado una fuerte motivación en la creación de nuevas alternativas para el manejo de insectos plaga, como el uso de agentes de control biológico, encontrándose en este grupo, los nemátodos entomopatógenos (NEP) (Adams y Nguyen, 2002; Shapiro-Ilan *et al.*, 2004; Grewal *et al.*, 2005). Éstos han sido aplicados exitosamente contra insectos plaga que habitan el suelo o se encuentran sobre la superficie en hábitats crípticos (Arthurs *et al.*, 2004; Shapiro-Ilan *et al.* 2006a).

Después del Phylum Arthropoda, Nematoda es uno de los más diversos y versátiles del reino animal, con más de 100.000 especies, que han logrado colonizar ambientes diversos como tundras, desiertos, ambientes marinos y aguas de diferentes orígenes como dulce, termales y congeladas (Stock *et al.*, 1998). Dentro de este grupo hay ocho familias que se consideran promisorias para el control biológico de insectos, Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Aphelenchidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (De Ley y Blaxter, 2002). Los NEP pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae han sido ampliamente estudiados, masivamente producidos y exitosamente utilizados en el control biológico de insectos que pasan alguna etapa de desarrollo en el suelo (Kaya y Gaugler, 1993; Lui *et al.*, 2000; Adams y Nguyen, 2002; Grewal *et al.*, 2001), ya que se caracterizan por su alta virulencia, gran rango de hospederos (Nicolls, 2008), amplia distribución geográfica y gran adaptabilidad (Kaya y Gaugler, 1993; Salas, 2002).

Steinernematidae comprende dos géneros, *Steinernema* y *Neosteinernema*, con más de 35 y sólo una especie reconocida, respectivamente. En campo, *Steinernema feltiae* presenta un alto número de registros de infecciones, especialmente sobre especies de los órdenes Lepidoptera (Noctuidae) y Coleoptera (Scarabeidae y Curculionidae) (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006b). Pero también puede ser una alternativa efectiva para el control de *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera, Tephritidae) (Lindgren y Vail, 1986; Lindgren *et al.*, 1990), *B. dorsalis* (Hendel) y *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae).

El hábitat natural de los NEP es el suelo, y se distribuyen extensamente a lo largo de todo el mundo (Hominick, 2002; Adams *et al.*, 2006). Esto hace que los NEP sean exitosamente utilizados en control de insectos que pasan alguna etapa de su desarrollo en este hábitat, como *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *Otiiorhynchus ovatus* (L.), *O.*

*sulcatus* (Fabricius) y *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2012), *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae) (Le Vieux y Malan, 2013), entre otras plagas importantes para la agricultura (Kaya y Gaugler, 1993; Lui *et al.*, 2000; Adams y Nguyen, 2002; Grewal *et al.*, 2005).

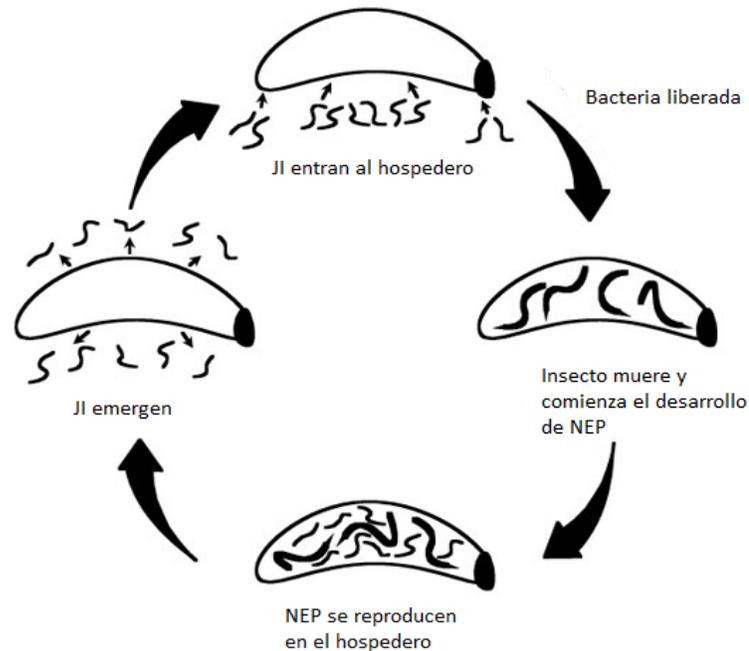
La acción de los NEP se basa en su asociación mutualista con bacterias patógenas específicas que se encuentran en su tubo digestivo (Liu *et al.*, 1997) y causan la muerte del insecto hospedero. En esta interacción los NEP protegen a la bacteria del ambiente externo, facilitan el transporte y penetración en el hemocele del insecto hospedero y probablemente inhiben proteínas antibacterianas de éste (Kaya y Gaugler, 1993). Las bacterias, por su parte, proveen a los NEP de nutrientes y generan compuestos antimicrobianos contra una amplia gama de microorganismos (Liu *et al.*, 1997). Steinernematidae se asocia a bacterias del género *Xenorhabdus* y Heterorhabditidae a *Photorhabdus*, ambas de la familia Enterobacteriaceae, gram negativas (Lui *et al.*, 2000).

### **Ciclo de vida**

El ciclo de vida de los NEP comprende cuatro estados juveniles. El juvenil tres es el estado infeccioso (JI), también llamado Dauer, y posee características que favorecen el proceso: es de vida libre, no se alimenta, limitando la pérdida de agua e ingreso de patógenos (Poinar *et al.*, 1990), tiene quimiorreceptores y capacidad de movimiento (Kaya y Gaugler, 1993). El ciclo infectivo comienza cuando los NEP ingresan al hospedero por aberturas naturales del cuerpo (boca, ano o espiráculos) o heridas (Figura 1). Una vez en el hemocele liberan las bacterias, las que se reproducen, generan infección y matan al insecto por septicemia en 24-48 horas (Poinar *et al.*, 1990; Adams y Nguyen, 2002; Peteira *et al.*, 2008). Luego, los NEP se alimentan de biomasa del insecto metabolizada por las bacterias, se reproducen en el cadáver del mismo y después de dos-tres generaciones, nuevos JI portando la bacteria en su aparato digestivo, salen en busca de otros hospederos (Kaya y Gaugler, 1993).

### **Ventajas y desventajas del uso de NEP**

Además de las características biológicas que favorecen su función como agentes de control biológico, los NEP presentan importantes ventajas, destacándose su nula toxicidad en vertebrados y su capacidad de buscar a su hospedero de forma activa. También pueden ser aplicados con equipos convencionales para plaguicidas y pueden ser almacenados por largos períodos sin perder su viabilidad y patogenicidad (hasta 12 meses en refrigeración). Todo esto, sumado a su compatibilidad con muchos plaguicidas, ha motivado su estudio y el desarrollo de formulaciones y actualmente existe una variedad de especies disponibles en el mercado extranjero para el control de plagas en plantaciones ornamentales, viveros, pastos, cultivos anuales y perennes y bosques (Kaya y Gaugler, 1993) y productos almacenados (Ramos-Rodríguez *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Ciclo de vida de NEP del género *Steinernema* (Shapiro–Ilan *et al.*, 2010)

Si bien los estudios sobre NEP han aumentado, su comercialización e implementación se concentra en América del Norte y Europa (Miles *et al.*, 2012). En el Cuadro 1 se encuentra una lista de referencia de proveedores (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2012).

**Cuadro 1.** Guía recomendada de proveedores de NEP

<p><b>Commercial Sources of Insect Parasitic Nematodes.</b> 2000. Compilado por P. Grewal y K. Power. Ohio State University.  <a href="http://www2.oardc.ohio-state.edu/nematodes/nematode_suppliers.htm">http://www2.oardc.ohio-state.edu/nematodes/nematode_suppliers.htm</a></p>
<p><b>Commercial Producers and Suppliers of Nematodes.</b> 2010. Compilado por D.I. Shapiro-Ilan y R. Gaugler. Cornell University.  <a href="http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.html">http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.html</a></p>
<p><b>Vendors of Beneficial Organisms in North America.</b> 2010. Compilado por J. White y D. Johnson. University of Kentucky College of Agriculture.  <a href="http://www.ca.uky.edu/entomology/entfacts/ef125.asp">http://www.ca.uky.edu/entomology/entfacts/ef125.asp</a></p>

No obstante, la insuficiente capacitación de productores, así como escasa divulgación acerca del uso correcto de estos organismos en el manejo de plagas, sigue siendo la principal desventaja del uso de NEP (Rodríguez *et al.*, 2011). Además poseen otros inconvenientes, como su limitada tolerancia a condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura, requerimientos de humedad, rayos UV, etc.); baja persistencia en campo, que obliga a hacer múltiples aplicaciones, utilizando altas concentraciones (Sharma *et al.*, 2011) y altos costos en comparación a los plaguicidas químicos (Kaya, 1993). Debido a lo anterior, surge la necesidad de definir concentraciones propias para cada especie de NEP en diversos sistemas de cultivo y ambientes, para tener un control eficiente de plagas específicas.

### **Factores que influyen en su establecimiento y acción**

Actualmente, el uso de los NEP en control de plagas es restringido, ya que requieren condiciones específicas para sobrevivir (Nicolls, 2008). La motilidad y persistencia de juveniles infectivos (JI) depende de factores intrínsecos, como factores genéticos, fisiológicos y de comportamiento (Kaya, 1990) y externos bióticos, como antibiosis, competencia y enemigos naturales (Kaya y Koppenhöfer, 1996; Petters, 1996). También son muy importantes factores ambientales, especialmente algunas características del suelo, como su humedad, temperatura, textura y salinidad (Gaugler, 1988; Hazir *et al.*, 2004).

En relación a los factores intrínsecos de los NEP, la capacidad para parasitar a sus hospederos está influenciada por el comportamiento de búsqueda del nemátodo. Se han descrito dos estrategias infectivas que influyen en la respuesta a los diferentes estímulos físicos y químicos que reciban (Lewis *et al.*, 2006). Por un lado, se encuentran los nemátodos navegantes (“cruisers”), los cuales buscan activamente a su presa y tienen una mayor probabilidad de encontrar insectos sedentarios o de hábitos crípticos (Campbell y Gaugler, 1993; Lewis *et al.*, 2006). Por otro lado, los nemátodos de emboscada o emboscadores (“ambushers”), permanecen sin moverse hasta que un hospedero se aproxime a ellos, momento en el cual acceden a éste por un salto apoyándose en la parte posterior de su cuerpo, llamado movimiento nictatorio (Lezama *et al.*, 2006). Además, existen NEP con comportamiento mixto (Campbell *et al.*, 2003), que responden positivamente a sustancias volátiles del hospedero, recorriendo una cierta distancia hasta localizar y acceder por salto o desplazándose hasta ingresar a la larva hospedera (Lezama *et al.*, 2006).

En relación al suelo, éste es un sistema dinámico que responde a cambios ambientales y donde las interacciones ecológicas entre organismos dependen de su estructura, la que determina la habitabilidad de los microorganismos en este medio (Elliot y Coleman, 1988). Un factor que incide en la capacidad infectiva de los NEP es la humedad del suelo, debido a que los nemátodos necesitan una película de agua en los espacios intersticiales de suelo para un movimiento efectivo. Cuando esta película de agua se vuelve demasiado delgada (suelo seco) o los espacios intersticiales están llenos de agua (suelo saturado), se restringe su movimiento (Koppenhöfer *et al.*, 1995; Grewal *et al.*, 2005). Otro factor ambiental importante es la temperatura de suelo, influenciando la tasa de desplazamiento de NEP a través de la estimulación/inhibición del sistema neuromuscular. La temperatura óptima varía en las distintas especies y cepas, por ejemplo, Nawaz *et al.* (2007), determinaron que *S. carpocapsae* es virulento a 25 ° C, pero *H. indica* es efectivo a 30 ° C. En general, los NEP se inactivan a temperaturas menores a 10°C y mayores a 40°C (Griffin *et al.*, 1993). Así, se ha definido que el rango de temperatura de suelo ideal para su aplicación va de 25 a 28°C (Miles *et al.*, 2012).

La textura del suelo también afecta la capacidad infectiva de los NEP y ha sido una de las características más estudiadas, por ser determinante en la supervivencia y movilidad del juveniles infectivos (JI) (Shapiro-Ilan *et al.*, 2000; El-Borai *et al.*, 2012). Esto se explica porque a medida que el tamaño de partículas de suelo disminuye, los poros se hacen más pequeños (Kaya, 1990), limitando la concentración de oxígeno, más aun si el suelo posee

una alta humedad (Koppenhopher y Fuzy, 2006), o el tamaño del NEP es mayor al tamaño del poro (Kaya, 1990; Shapiro Ilan *et al.*, 2000).

El éxito en la utilización de NEP como agentes de control también depende del manejo que se haga de éstos. Por ejemplo, las concentraciones utilizadas, ubicación de la aplicación en relación a los insectos plaga, métodos de aplicación, textura de suelo, entre otros factores, van a determinar su sobrevivencia en el campo y acceso a los hospederos (El-Borai *et al.*, 2012).

Diferentes especies y cepas de NEP se han aislado de todos los continentes, a excepción de la Antártida (Hominick, 2002), lo que demuestra su gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales diversas (Salas, 2002). Por esta razón, un programa eficaz de control biológico, debería considerar las características y necesidades específicas del nemátodo que se desea utilizar, ya sea en lugares donde son introducidos o donde habitan naturalmente (Kaya, 1990). Por esto, al contar con nuevos aislamientos nativos, es fundamental realizar estudios que proporcionen información en relación a su potencial para ser utilizados contra insectos plagas locales, debido a que están adaptados a las características propias del lugar (Nguyen, 2009). Estos estudios generalmente se realizan con el hospedero *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae), polilla de la cera, plaga de colmenas de abejas que en fase larval destruye panales, la cual al ser extremadamente susceptible a NEP, se ha convertido en el hospedero modelo, permitiendo la detección de cepas en los diferentes hábitats del mundo (Karban *et al.*, 2011).

### Uso de NEP en Chile

Si bien en Chile la estrategia de control de plagas a través de NEP es poco conocida, ha aumentado considerablemente en la última década, debido a que nuestro país posee una alta variedad de ecosistemas, permitiendo el desarrollo de una rica fauna de estos organismos con diferentes rangos de adaptaciones medioambientales (Edgington *et al.*, 2010). Es por esta razón que el Centro Regional INIA Quilamapu e investigadores del Centro Internacional CABI, muestrearon desde la Patagonia hasta el Altiplano Chileno, obteniendo 12 aislamientos de NEP (INIA, 2007), dos cepas nativas de *Heterorhabditis* y dos cepas nativas de *Steinernema* denominadas *S. unicornium* E. (Edgington *et al.*, 2009a) y *S. australe* E. (Edgington *et al.*, 2009b), en seis regiones de Chile (Edgington *et al.*, 2010). Paralelamente, a partir estos trabajos se potenció la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) creada en 1990, la cual tiene carácter público y en 2010 fue clasificada con el estatus de Autoridad Internacional de Depósito, siendo el único banco con estas características en Latinoamérica. En ella se encuentran incorporadas más de dos mil microorganismos entre hongos, bacterias y NEP, de los cuales, 103 pertenecen a los últimos (CChRGM, 2012).

Igualmente, la misma institución, INIA Quilamapu el año 2009 estableció que los aislamientos nativos encontrados el año 2007, han mostrado promisorios resultados en el control de especies como *Asynonychus cervinus* (Boheman), *Aegorhinus superciliosus* (Guerín) y *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae), todas especies

que poseen estados larvarios y habitan en el suelo, alimentándose de raicillas y causando un severo daño a los cultivos (Merino y France, 2009). Posteriormente, la Fundación de Innovación Agraria (2011) realizó un amplio estudio sobre el control biológico para *A. superciliosus* mediante la selección de aislaciones específicas de NEP en avellano europeo y arándano, obteniendo resultados positivos, tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

En este mismo contexto, en el año 2010 el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile realizó una prospección de nemátodos entomopatógenos en la IX Región, con el objetivo de obtener aislamientos adaptados a condiciones locales. Aquí, en la localidad de Licán Ray, caracterizada por un clima templado lluvioso, se encontraron las especies *Steinernema feltiae*; *S. unicornium* una nueva especie denominada *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, que podría pertenecer al grupo *feltiae* (Flores, 2012). Posteriormente, el 2012 se evaluó el comportamiento del nuevo aislamiento sobre *G. melonella*, bajo distintas temperaturas, humedades y concentraciones. Los mejores resultados se obtuvieron a 25°C y a capacidad de campo, cuando estaban insertos en un sustrato arenoso. No hubo efecto de la concentración después de 3 días de aplicados los NEP, siendo altamente eficiente (Alvarado, 2012). Luego, el 2013 se evaluó su virulencia en *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (datos no publicados) y en el daño sobre *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) (Burgos, 2014<sup>1</sup>, comunicación personal) provocando mortalidad en ambas especies hospederas en condiciones de laboratorio.

Dado que el aislamiento *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray muestra potencial para el control de especies plaga de importancia económica, en la siguiente investigación se evaluó como la textura de suelo afecta en la capacidad de desplazamiento e infectividad de este NEP, utilizando como hospedero larvas de *Galleria mellonella* (L.).

---

<sup>1</sup> Burgos. E. 2014, enero. Control de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) con *Steinernema* sp. [Entrevista personal]. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

## LITERATURA CITADA

- Adams, B. and K. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. (cap. 1, pp. 1-35). In: Gaugler, R. (ed.), *Entomopathogenic nematology*. New York, EE.UU: CABI. 400p.
- Adams B.; A. Fodor; H. Koppenhöfer; E. Stackebrandt; P. Stock and M. Klein. 2006. Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37: 32–49.
- Alvarado, A. 2012. Hábitos parasitarios y comportamiento de un aislamiento nativo del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. en larvas de *Galleria mellonella* (L.) Memoria de Título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 39p.
- Arthurs, S.; K. Heinz and J. Prasifka. 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Journal Entomology*, 94: 297–306.
- Campbell, J. and R. Gaugler. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal Behaviour*, 126:156–169.
- Campbell, F.; E. Lewis; P. Stock; S. Nadler and H. Kaya. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 35: 142-145.
- CChRGM (Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos), Chile. 2012. Banco de Recursos Genéticos Microbianos.  
Disponible en: <http://www.cchrgm.cl/index.html>. Consultado el 20 de marzo del 2014
- De Ley, P. and M. Blaxter. 2002. Systematic position and phylogeny. (cap. 3, pp. 1-30). In: Lee, L. (ed.). *The biology of nematodes*. New York, EE.UU: Taylor and Francis. 1252p.
- Edgington, S.; A. Buddie; F. Tymo; A. France; L. Merino and D. Hunt. 2009a. *Steinernema unicornium* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 12: 113-131.
- Edgington, S.; A. Buddie; L. Tymo; D. Hunt; K. Nguyen and D. Moore. 2009b. *Steinernema austral* (Panagrolaimomorpha; Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. *Journal Nematology*, 11: 699-717.
- Edgington, S.; A. G. Buddie; D. Moore; A. France; L. Merino; L. Tymo and D. Hunt. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Journal Nematology*, 12: 915-928.
- Elliott, E. and D. Coleman. 1988. Let the soil work for us. *Ecological Bulletins*, 39: 23-32.

El-Borai, F; R. Stuart; R. Campos-Herrera; E. Pathak and L. Duncan .2012. Entomopathogenic nematodes, root weevil larvae, and dynamic interactions among soil texture, plant growth, herbivory, and predation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109:134–142.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria), Chile. 2011. Resultados y lecciones en el biocontrol del cabrito de los frutales. Regiones del Biobío, de La Araucanía, de Los Ríos y de Los Lagos, Chile: FIA. 30p (Serie Experiencias de Innovación para el emprendimiento agrario N°89: Biocontrol).

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.

Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 24: 351–360.

Grewal, S.; E. De Nardo and M. Aguilera. 2001. Entomopathogenic Nematodes: Potential for Exploration and use in South America. *Neotropical Entomology*, 30: 191-205.

Grewal, P.; S. Ehler and D. Shapiro-Ilan. 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, CABI International. London, UK. 513p.

Griffin, C. 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: Implications for the success of biological control programmes. (cap. 14, pp. 115-126). In: Bedding, R.; R. Akhurst and H. Kaya (ed.). Nematodes and the biological control of insects. Melbourne, Australia: CSIRO publications. 178p.

Hazir. S.; H. Kaya; P. Stock and N. Keskün. 2004. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil Pests. *Turkish Journal of Biology*, 27: 181-202.

Hominick, W. 2002. Biogeography. (cap. 1 pp. 115-143) In: Gaugler, R. (ed.). Entomopathogenic nematology. Wallingford, UK: CABI. 400p.

INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), Chile. 2007. Prospección de nemátodos entomopatógenos.

Disponible en: <http://www.inia.cl/link.cgi/quilamapu/noticias/605>: Consultado el 3 de septiembre de 2012.

Kaya, H. 1990. Soil ecology. (cap. 3, pp. 93–116). In: Gaugler, R., and H. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control. Philadelphia, EE.UU. 365p.

Kaya, H. 1993. An overview of insect-parasitic and entomopathogenic nematodes. (cap. 1, pp. 1- 18). In: Bedding, R.; R. Akhurst and H. Kaya (ed.). *Nematodes and the biological control of insect pests*. Melbourne, Australia: Csiro Publishing. 178p.

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

Kaya, H. and Koppenhöfer, M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6:357-372.

Karban, R.; A. Hodson; D. Gruner; E. Lewis; J. Karban; M. Joseph; T. Mata and D. Strong. 2011. Lack of susceptibility of soil-inhabiting *Platyrepia virginialis* caterpillars, a native arctiid, to entomopathogenic nematodes in nature. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140: 28–34.

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

Koppenhöfer, M. 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.

Le Vieux, P. and A. Malan. 2013. The Potential Use of Entomopathogenic Nematodes to Control *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal Entomology Viticulture*, 1: 296-306.

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

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: 41–49.

Liu, J.; R. Berry and A. Moldenke. 1997. Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *Journal of invertebrate pathology*, 69: 246–252.

Liu, J.; G. Poinarand and R. Berry. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annual Review of Entomology*, 45: 287-306.

- Lindgren, E. and P. Vail. 1986. Susceptibility of Mediterranean fruit fly, melon fly, and Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. *Environmental Entomology*, 15: 465–468.
- Lindgren, E.; T. Wong and D. McInnis. 1990. Response of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. *Environment Entomology*, 19: 383–386.
- Merino, L. y A. France. 2009. Control biológico de insectos plaga de importancia económica. *INIA tierra adentro*. 24-25
- Miles, C.; C. Blethen; R. Gaugler; D. Shapiro-Ilan and T. Murray. 2012. Using entomopathogenic nematodes for crop insect pest control. Washington State University. EE. UU. 11p.
- Nawaz, A; N. Jan; G. Mahar; M. Hullio; A. Lanjar and A. Buriro. 2007. Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes against the Larvae of Mustard Beetle *Phaedon cochleariae* at Different Temperatures. *International Journal of Agriculture y Biology*, 9: 851–856.
- Nicolls, C. 2008. Control biológico de insectos, enfoque agroecológico. Primera edición. Ciencia y Tecnología, Medellín, Colombia. 277p.
- Nguyen, K.B. 2009. Morphology and taxonomy of entomopathogenic nematodes. Disponible en: <http://entnem.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>. Consultado el 14 de enero del 2014.
- Peteira, B.; M. Rodríguez; C. Rosales y E. Salazar. 2008. Uso de técnicas moleculares en la identificación de nemátodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotas. Revista digital del Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas, Venezuela. 16p.
- Petters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* sp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 389-402.
- Poinar, G., Thomas, J.R. and B. Lighthart. 1990. Bioassay to determine the effect of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* on entomogenous Rhabditoid nematodes. *Agricultural Ecosystem Environmental*, 30: 195- 202.
- Ramos-Rodríguez, O.; J. Campbell and S. Ramaswamy. 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored-product insect pests. *Journal of Stored Products Research*, 241–252.
- Rodríguez, M.; L. Rosales; R. Enrique; L. Gómez; E. González y B. Peteira. 2011. Los nemátodos entomopatógenos y su uso como agentes de control biológico para el manejo de plagas agrarias. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Cuba, 95p.

- Salas, M. 2002. Distribución natural de nemátodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae y Heterorhadtidae) en sistemas agroecológicos de Zacatecas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima, Tlaxiaco, México. 164p.
- Shapiro-Ilan, D.; C. McCoy; A. Fares; T. Obreza and H. Dou. 2000. Effects of Soil Type on Virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Biological Control*, 29: 1083-1087.
- Shapiro-Ilan, D.; M. Jackson; C. Reilly and M. Hotchkiss. 2004. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological control*, 30: 119–126.
- Shapiro-Ilan, D.; H. Gouge; J. Piggott and J. Patterson. 2006a. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Journal Biological Control*, 38: 124-133.
- Shapiro-Ilan, D.; T. Cottrell; A. Brown; K. Gardner; K. Hubbard and B. Wood. 2006b. Effect of soil moisture and a surfactant on entomopathogenic nematode suppression of the pecan weevil, *Curculio caryae*. *Journal of Nematology*, 38: 474–482.
- Shapiro-Ilan, D.; T. Cottrell; R. Mizell; D. Horton; B. Behle, and C. Dunlap. 2010. Efficacy of *Steinernema carpocapsae* for control of the lesser peach tree borer, *Synanthedon pictipes*: Improved aboveground suppression with a novel gel application. *Biological Control*, 54: 23–28.
- Shapiro-Ilan D. and R. Gaugler. EE.UU. 2012. Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhadtidae).  
Disponibile en: <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.php>. Consultado: 17 de mayo de 2014.
- Sharma, M.; A. Sharma and S. Hussaini. 2011. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialization status - a mini review. *Phytopathology and Plant Protection*, 44: 855-870.
- Stock, P.; V. Somsook and P. Reid. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditidae: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Systematic Parasitology*, 41: 105-113.

## **CAPÍTULO II: EFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD EN LABORATORIO DE *Steinernema* sp. AISLAMIENTO LICÁN RAY**

### **RESUMEN**

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) son considerados como una solución efectiva en el control de plagas del suelo, ya que son capaces de desplazarse en este hábitat para encontrar y parasitar al insecto hospedero. En este estudio se determinó la capacidad infectiva de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, en suelos de textura arenosa, franca y arcillosa, bajo condiciones de laboratorio. Primero se determinó la concentración adecuada en la arena experimental, por lo que se aplicaron concentraciones de 10, 50 y 100 JI cm<sup>-2</sup>. Posteriormente se midió el desplazamiento de los NEP, tanto vertical como horizontal, en arenas experimentales de 30/50/70 y 10/20/30/40 cm, respectivamente, utilizando como hospedero larvas de *Galleria mellonella* (L.). En los tres ensayos se midió la mortalidad al día 3, 6 y 9 después de la aplicación de los NEP. Todas las concentraciones de NEP provocaron 100% de mortalidad en todos los suelos, excepto en suelo arcilloso, donde se observó menor eficacia al utilizar la menor concentración. La velocidad de infección fue mayor cuando se aplicaron 50 y 100 JI cm<sup>-2</sup> en las tres texturas. La capacidad de los NEP de desplazarse verticalmente e infectar al hospedero a 30 cm fue de 100% en todos los suelos, tardando más horas en infectar larvas en suelo arenoso. A 50 y 70 cm la mortalidad disminuyó, manteniendo el suelo franco la mayor eficacia. Al desplazarse horizontalmente, se observó diferencias a partir de los 30 cm en todos los suelos, siendo el NEP más eficiente en suelo franco y menos eficiente en suelo arenoso. Los resultados del presente estudio sugieren que *Steinernema* sp. tiene la capacidad de desplazarse tanto vertical como horizontalmente, pero su eficiencia en atacar al hospedero depende de la textura del suelo en que se encuentren.

**Palabras clave:** Nemátodos entomopatógenos, plagas del suelo, control microbiológico, nemátodos cruisers

## **CAPÍTULO II: EFFECT OF SOIL TEXTURE ON THE MOVEMENT CAPABILITY AND INFECTIVITY OF *Steinernema* sp. STRAIN ISOLATE LICÁN RAY IN THE LABORATORY**

### **ABSTRACT**

Entomopathogenic nematodes (EPN) are considered an effective solution for the control of soil pests due to their capacity of moving in this habitat to find and parasitize the insect host. This study evaluated the infectivity of *Steinernema* sp. strain Licán Ray in sandy, loam and clay textured soils, under laboratory conditions. Firstly, concentrations of 10, 50 and 100 JI cm<sup>-2</sup> were evaluated to establish the appropriate concentration of EPN in the experimental sand. Second, the displacement capacity of the EPN both vertically and horizontally was evaluated in experimental arenas at 30/50/70 and 10/20/30/40 cm, respectively, using *Galleria mellonella* (L.) larvae as host. In all three trials host mortality was evaluated at day 3, 6 and 9 after application of EPN. The results show that all EPN concentrations used caused 100% mortality in all soils, except for clay soil, where the efficacy decreased with the lowest concentration. The velocity of infection was highest with 50 to 100 cm<sup>-2</sup> JI in all soil textures. The EPN capacity of vertically displacement and infection of the host at 30 cm was 100% in all textured soils, taking longer to infect larvae in sandy soil. At 50 and 70 cm mortality decreased, showing the loam soil the highest efficacy. When moving horizontally, differences were observed from 30 cm up in all textured soils, being EPN most efficient in loam and least efficient in sandy soil. These results suggest that *Steinernema* sp. has the capacity to displace in the soil, both horizontally and vertically, but their efficiency in attacking the host depends on the texture of the soil.

**Keywords:** Entomopathogenic nematodes, soil pest, microbiological control, cruisers nematodes

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) habitan naturalmente suelos de todo el mundo (Hominick, 2002), por lo que han sido usados para el control biológico de insectos plaga que habitan principalmente en este hábitat (Kaya y Gaugler, 1993). El estado juvenil infectivo (JI), de vida libre y sin alimentación, se mantiene en el suelo hasta localizar e infectar un nuevo huésped (Kaya y Gaugler, 1993; Koppenhöfer y Fuzy 2006), acción que está condicionada por factores extrínsecos (temperatura, humedad, textura de suelo, pH, contenido de materia orgánica) que influyen en su comportamiento de búsqueda (Campos-Herrera *et al.*, 2014), capacidad de sobrevivir, distribución y desplazamiento después de su aplicación en campo (Poinar y Hom, 1986). Dentro de los factores mencionados, uno de los más relevantes es la textura del suelo (Miles *et al.*, 2012). En suelos arcillosos, por ejemplo, el menor tamaño de poros dificulta el desplazamiento del NEP hacia el hospedero, lo que resulta en menor abundancia de NEP. Esto se debe a la menor concentración de oxígeno en poros pequeños, y a que los JI de algunas especies de NEP podrían tener un diámetro mayor que el poro del suelo (Hazir *et al.*, 2004). Por otra parte, en suelos de textura arenosa, que presentan una mayor porosidad gruesa, es posible un desplazamiento continuo, una mayor sobrevivencia y abundancia de JI entre las partículas de suelo, localizando su presa con mayor facilidad (Miduturi *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 1999; Portillo-Aguilar *et al.*, 2000; Hazir *et al.*, 2004). La humedad del suelo está ligada directamente a la textura. El tamaño de partícula y el contenido de materia orgánica de un suelo influyen en la disponibilidad de agua en éste, lo que condiciona la sobrevivencia de los NEP, puesto que son organismos acuáticos que necesitan una película de agua continua para su desplazamiento (Gouge *et al.*, 2000; Koppenhöfer y Fuzy., 2006; Miles *et al.*, 2012).

En la utilización de formulados en base a NEP para el control de plagas del suelo, la correcta aplicación en campo depende, entre otros factores, de la capacidad de desplazamiento del NEP utilizado (Poinar y Hom, 1986; Cutler y Webster, 2003). Se ha demostrado que la habilidad de desplazamiento tiene una estrecha relación con el comportamiento de búsqueda y las señales recibidas desde el hospedero, ya que se facilita el encuentro entre éste y el NEP (Campbell *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Steinernema carpocapsae* (Weiser) nemátodo con comportamiento de búsqueda “de emboscada”, tiende a permanecer sin desplazarse cerca de la superficie del suelo, a la espera de un hospedero hasta infectar insectos móviles que se le acercan abordándolos con un salto (Campbell y Gaugler, 1988; Kaya y Gaugler, 1993), sin ser importante el efecto de la señal del hospedero (Lewis *et al.*, 1993). En cambio *S. glaseri*, con comportamiento de búsqueda “de navegante”, se ubica a mayores profundidades de suelo, desplazándose distancias de hasta 40 cm en respuesta a la señal del hospedero (Campbell y Gaugler, 1993; Kaya y Gaugler, 1993; Campbell *et al.*, 2003). También existen NEP de comportamiento intermedio o mixto, que responden positivamente a sustancias volátiles del hospedero (Campbell *et al.*, 2003). Susurluk (2008) mostró en sus resultados que, en suelo arenoso, *Steinernema feltiae* (Filipjev), conocida por su comportamiento de búsqueda intermedio, poseía una mayor

capacidad de desplazamiento vertical que *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), conocido por su comportamiento navegante.

Debido al comportamiento de búsqueda de los NEP, al momento de controlar un insecto plaga en terreno, las concentraciones utilizadas son muy variables ( $0,1$  a  $1 \times 10^6$  JI  $m^{-2}$ ) y lo mismo ocurre con el número de aplicaciones en campo (Sharma *et al.*, 2011). Por ejemplo, Miles *et al.* (2012) recomiendan una concentración de 250.000 NEP  $m^{-2}$  para terrenos pequeños. Además si los NEP son aplicados en banda al lado del cultivo, se pueden utilizar menores concentraciones. Una investigación realizada en la Universidad de Florida demostró que 50.000 NEP  $m^{-2}$  en banda cerca del cultivo proporciona un control efectivo de *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) en huertos de cítricos (Duncan *et al.* 1999).

Actualmente, existen pocos antecedentes en relación a las concentraciones adecuadas de NEP para diferentes tipos de suelo y de nuevos aislamientos para múltiples plagas. Sólo Lezama-Gutiérrez *et al.* (2006) evaluaron la eficacia de *Steinernema riobrave* (Poinar) en *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) sobre tres suelos de clase textural contrastante y tres concentraciones. Los resultados mostraron una mayor mortalidad en suelos livianos y concentraciones elevadas de NEP.

En Chile, desde el 2006 se busca aislar nuevas cepas con diferentes adaptaciones ambientales a lo largo de todo el país (Edgington *et al.*, 2010), las cuales han sido probadas en diferentes hospederos en condiciones de laboratorio. Sin embargo, es necesario evaluar la eficacia en campo de los diferentes aislamientos para el control efectivo de plagas agrícolas, teniendo en consideración los factores que influyen es su capacidad de ataque, como la textura de suelo.

El presente estudio buscó determinar la capacidad infectiva de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, perteneciente probablemente al grupo *feltiae*, según Flores (2012), sobre suelos de texturas, arenosa, franco y arcillosa, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Para esto se utilizaron larvas de *G. mellonella* (L.), hospedero altamente susceptible a NEP (Karban *et al.*, 2011). La investigación se dividió en dos etapas. En la primera se estableció la concentración adecuada de NEP para cada textura de suelo, y en la segunda se determinó su capacidad de desplazamiento, tanto horizontal como vertical. En ambos casos, las mediciones se realizaron a los 3, 6 y 9 días después de la aplicación, para determinar el tiempo que demora el nemátodo en parasitar su hospedero.

## **HIPÓTESIS**

La textura del suelo afecta la actividad del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray para detectar e infectar larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la infectividad de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en solución acuosa sobre *Galleria mellonella* (L.) en suelos de textura arcillosa, franca y arenosa, en condiciones de laboratorio.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el efecto de la concentración en solución acuosa de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray sobre la mortalidad de larvas de *G. mellonella* (L.), en suelos de textura arcillosa, franca y arenosa.

Evaluar la capacidad de desplazamiento vertical y horizontal de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en suelos de textura arcillosa, franca y arenosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

Este estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Nematología y de Entomología de Cultivos, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Comuna de La Pintana, Santiago, Región Metropolitana.

### Nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray fueron obtenidos de material propagado *in vivo* existente en el Laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

Se estableció una crianza de acuerdo al protocolo descrito por Kaya y Stock (1997), utilizando larvas de último estado de *G. mellonella* (L.), donde los JI se obtuvieron a través de trampas White, después de 10 días en cámara oscura a 25 °C, para posteriormente ser mantenidos y almacenados en agua a 8°C, por un máximo de 5 días, hasta su utilización (Bruck *et al.* 2005).

### Crianza de *G. mellonella* (L.) (Polilla de la cera)

Colonias de *G. mellonella* fueron criadas en laboratorio, con dietas artificiales siguiendo el método utilizado por Zamorano (2009). Se mantuvieron cámara oscura a 25° C, utilizando contenedores plásticos de (15x15x25 cm) con tapa adaptada con una malla metálica para permitir la ventilación de larvas. Para la ovipostura de adultos se utilizaron envases de vidrio con papel acerado, que luego de 24 horas era extraído y localizado en los contenedores con dieta.

### Suelos

Los suelos de textura arenosa y arcillosa se obtuvieron de un predio localizado en la Sexta Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Comuna de Pichidegua (Cuadro 2). El suelo de textura franca se obtuvo del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Comuna de La Pintana, Santiago.

**Cuadro 2.** Propiedades físicas de los suelos utilizados: 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%). Textura, de acuerdo al % de arcilla (A), limo (L), y arena (a).

Clase textural	Capacidad =volumétrica de retención de agua (%)			Textura (%)		
	CC	PMP	(HA)	a	A	L
Arcillosa	39,00	19,00	20,00	19,00	52,00	19,00
Franco arenosa	18,03	8,92	9,11	69,20	8,60	22,20
Franco	22,00	14,00	8,00	38,80	20,80	40,40

Fuente: CIREN RM (1996); Claudia Rojas (2014); Laboratorio de Física de Suelos U. de Chile (2014)

Para descartar la posible presencia de otros NEP y bioantagonistas, los suelos fueron expuestos a temperaturas de 70°C por dos horas. Para esto se puso el suelo húmedo en un recipiente metálico con tapa, de 30 cm de diámetro y 50 de alto, el cual se colocó dentro de otro recipiente metálico con agua, también con tapa. Éste se calentó sobre una cocina para que el agua se mantuviera en ebullición durante el período requerido. La temperatura del suelo se controló con un termómetro cada media hora (Aballay, 2013 comunicación personal<sup>2</sup>) (Figura 2).



**Figura 2.** Recipientes utilizados para eliminar la carga microbiológica de los suelos.

En el caso del suelo arcilloso debido a la presencia de agregados, se pasó por tamiz de 5 mm de modo de conseguir un tamaño de partículas homogéneo.

La humedad de todos los suelos utilizados para cada tratamiento se homogenizó a capacidad de campo. Para esto, se depositaron en macetas de 10 litros y se regaron abundantemente con agua destilada. El exceso de agua se eliminó por drenaje durante 24 a 48 horas. (Nájera, 2013, comunicación personal<sup>3</sup>). Para homogeneizar la temperatura de los

<sup>2</sup> Aballay, E. 2013, marzo. Eliminación de bioantogonistas del suelo. [Entrevista personal]. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

<sup>3</sup> Nájera, F. 2013, abril. Humedad del suelo. [Entrevista personal]. Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

suelos de los distintos tratamientos, todo este proceso se realizó dentro de una cámara, de doble aislamiento térmica, a  $25 \pm 2$  °C de temperatura.

### Arena experimental

La arena experimental consistió en tubos de PVC, de 75 mm de diámetro y largo variable según los tratamientos de cada experimento, con una entrada en la parte superior para incorporar el suelo, la que se mantuvo tapada para evitar la pérdida de agua por evaporación. Además, cada tubo tiene una entrada lateral por donde se introdujo una placa Petri con cinco larvas de último estadio de *G. mellonella* L. (Figura 3). Ambas caras de la placa Petri fueron modificadas, reemplazando parte del plástico por malla de acero inoxidable. En la placa se agregó el suelo (de textura correspondiente a cada tratamiento) y las larvas, para que existiera continuidad entre el suelo dentro del tubo y el interior de la placa (Figura 4).



**Figura 3.** Arena experimental: Tubo de PVC.



**Figura 4.** (a) Placas Petri plásticas con malla de acero inoxidable en ambas caras, (b) se llenan con suelo y se colocan cinco larvas de *G. mellonella* de último estadio, y (c) la placa se introduce dentro del tubo de PVC con suelo del mismo tipo.

Antes de montar los ensayos, se hicieron pruebas preliminares para evaluar el tiempo de sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* sin alimentación dentro de las placas y tubos con suelo esterilizado. Los resultados obtenidos, revelaron que las larvas son capaces de vivir 12 días sin alimentación y en ausencia de una conducta de canibalismo, ni muerte por aplastamiento a causa de la placa.

## Experimento 1. Determinación de concentración de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray

Para evaluar el efecto de las concentraciones de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray sobre la mortalidad del hospedero (*G. mellonella*) en suelos de textura arcillosa, franca y arenosa, se procedió de la siguiente manera:

Se llenó cada tubo de 20 cm de largo (Figura 3) con el suelo esterilizado a capacidad de campo, correspondiente a cada tratamiento. Se colocó la placa Petri con suelo y 5 larvas utilizando la abertura lateral del tubo (Figura 4), se rellena los espacios con el suelo correspondiente para crear un continuo entre el suelo dentro de la palca y fuera de ésta, y esta abertura se cubrió con una tapa de plástico con ventilación para permitir intercambio gaseoso. Con la ayuda de una pipeta se aplicó en la abertura superior del tubo 5 ml de la solución de agua destilada con NEP a las distintas concentraciones: 0; 440, 2.200 y 4.400 nemátodos/tubo, las que definieron los tratamientos, cada uno con cinco repeticiones (Figura 5a). Estas concentraciones se calcularon en base a  $0,1 - 1 \times 10^{10}$  nemátodos  $ha^{-1}$  (Sharma *et al.*, 2011). La pipeta ayudó a evitar estrés en los nemátodos, ya que la solución es distribuida de forma homogénea. Los tubos se mantuvieron en cámara oscura a  $25 \pm 2^\circ C$ .



**Figura 5.** Aplicación de NEP con una pipeta (a). Arena experimental para establecer concentración de *Steinernema* sp. sobre *G. mellonella* en suelos de distinta texturas (b).

Las placas Petri fueron revisadas a los 3, 6 y 9 días después de la aplicación (DDA), para observar y registrar los síntomas de infección causados por las bacteria contenidas en los NEP, los cuales consisten en un cambio de color del hospedero desde ocre a negro (Poinar *et al.*, 1986) (Figura 6). Posteriormente las larvas con síntomas se lavaron con agua destilada, se traspasaron a trampas White (Figura 7), y fueron mantenidas en cámara oscura a  $25^\circ C$  por 10 días, para verificar si existía infección. En base a estos resultados se calculó el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento. Cada repetición fue completada a los 19 días desde su montaje.



**Figura 6.** Síntomas de infección causados por bacterias del género *Steinernema*, coloración marrón en larvas de *G. mellonella* (L.).



**Figura 7.** Traslado de larvas de *G. mellonella* muertas desde placa Petri con malla (a) a trampa White (b) y caída de JI de *Steinernema* sp. al agua después de 10 días (c).

Para ratificar la viabilidad de los NEP utilizados y la correcta aplicación de la metodología, se contó con “larvas centinela”, es decir, larvas inoculadas de forma directa en placas Petri con la misma solución utilizada en los tratamientos. El tratamiento centinela no se incluyó en el análisis estadístico.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloques aleatorizados (DBCA) con estructura factorial 3x4, siendo los factores la textura y las concentraciones de NEP. El experimento constó de 12 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento, donde cada bloque incluyó una repetición de cada tratamiento. La unidad experimental correspondió a cinco larvas de *G. mellonella*. El porcentaje de mortalidad obtenido se sometió a un análisis de varianza, previa normalización mediante transformación angular de Bliss. Los resultados se sometieron a un test de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significación del 5%.

Además, para facilitar la interpretación de los resultados, se realizó ANDEVA y posterior test de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=5\%$ ), cuando fuera necesario, para:

- 1) Mortalidad acumulada al día 9 en suelos de la misma textura.
- 2) Para una misma fecha, se comparó la mortalidad en los suelos de diferentes texturas.

## **Experimento 2. Capacidad de desplazamiento horizontal y vertical de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en el suelo**

Para evaluar la capacidad del NEP nativo *Steinernema* sp. de desplazarse vertical y horizontalmente hacia el hospedero, en los tres tipos de suelos, se procedió de la siguiente manera:

Tubos de PVC (Figura 3) de 7,5 cm. de diámetro se llenaron con el suelo esterilizado y se mantuvieron a la capacidad de campo correspondiente a cada textura. Los tubos tienen un largo variable según el tratamiento:

- Para evaluar desplazamiento vertical: 30, 50, 70 cm.
- Para evaluar desplazamiento horizontal: 10, 20, 30 y 40 cm.

Esta distancia se midió desde la abertura superior, donde se aplica la solución con nemátodos hasta la abertura lateral, donde se ubica la placa Petri con las larvas (Figura 9).

Las placas Petri con suelo se ubicaron en la abertura lateral de los tubos, luego se rellenaron con el suelo correspondiente y se taparon las aberturas con una tapa de plástico con ventilación para permitir intercambio gaseoso. Con la ayuda de una pipeta se aplicó en la entrada superior del tubo, 5 ml de la solución de agua destilada con NEP a una concentración que fue calculada en base a los resultados del experimento 1.

Los tubos se mantuvieron en cámara de la misma forma que en el Experimento 1.

Antes de aplicar la solución con NEP en los tubos, para evaluar movimiento horizontal se dispusieron acostados sobre un mesón y con la abertura lateral hacia arriba (Figura 8). Aquellos tubos utilizados para medir movimiento vertical, se dejaron apoyados en el piso de la cámara, en forma vertical (Figura 9).



**Figura 8.** Experimento 2, desplazamiento horizontal.



**Figura 9.** Experimento 2, desplazamiento vertical

De la misma forma que en el experimento 1, las placas Petri fueron revisadas a los 3, 6 y 9 días después de aplicación (DDA), y las larvas luego traspasadas a trampa White para verificar la infección. En base a estos resultados se calculó el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento.

Para corroborar la viabilidad de los NEP se utilizaron larvas centinela, de igual manera que el Experimento 1.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente aleatorizado (DBCA) con estructura factorial 3x4 en movimiento horizontal y 3x3 en movimiento vertical, siendo los factores la textura y la distancia hospedero-NEP. Los experimentos para medir movimiento vertical y horizontal constaron de 12 y 9 tratamientos, respectivamente, y 5 repeticiones por tratamiento, donde cada bloque corresponde a una repetición. La unidad experimental corresponde a cinco larvas de *G. mellonella* en una placa Petri. El porcentaje de mortalidad acumulado obtenido se sometió a un análisis de varianza, previa normalización mediante una transformación angular de Bliss. Los resultados se sometieron a un test de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significación del 5%.

Se realizó un ANDEVA con todos los resultados para verificar si existieron interacciones entre los factores.

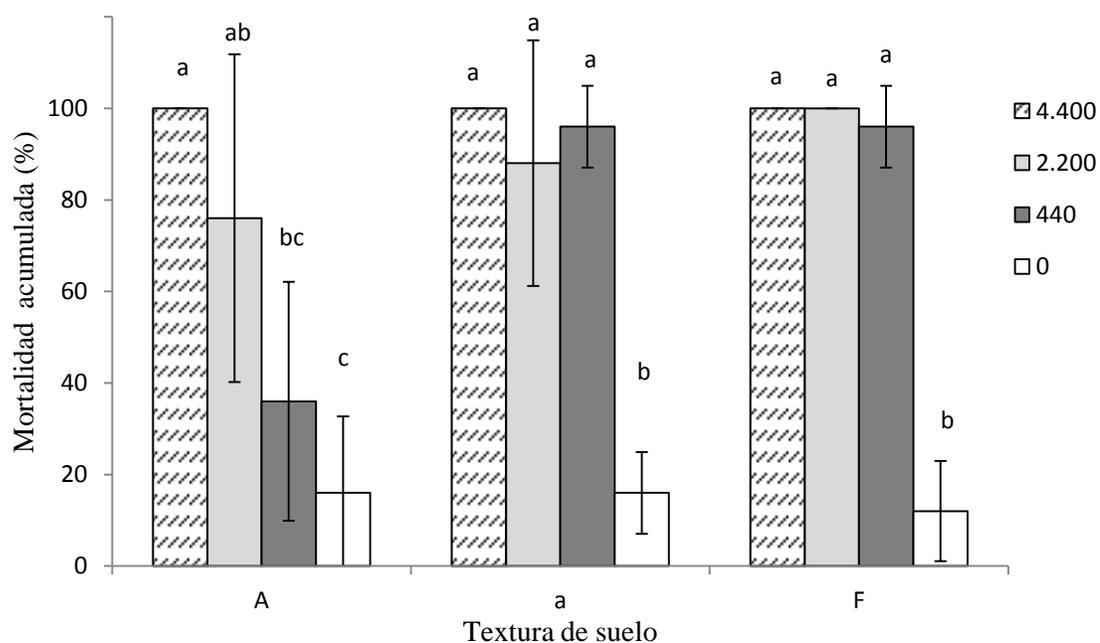
Además, para facilitar la interpretación de los resultados, se realizó ANDEVA y posterior test de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=5\%$ ), cuando fuera necesario, para:

- 1) Mortalidad acumulada al día 9 en suelos de la misma textura.
- 2) Para una misma fecha, se comparó la mortalidad en los suelos de diferentes texturas.

## RESULTADOS

### Efecto de la concentración de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray sobre la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* (L.), en suelos de textura diferente

A partir del análisis estadístico se estableció que existe interacción entre los factores ( $P=0,01$ ) (Apéndice I), es decir, se observa un efecto combinado de la textura y la concentración de *Steinernema* sp., a los 9 días después de aplicados, en la muerte de larvas de *G. mellonella*, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.



**Figura 10.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* 9 días después de la aplicación de, 4.400, 2.200, 440 y 0 NEP/tubo en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F). Distintas letras sobre las barras, correspondientes a un mismo tipo textural, representan diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

Posteriormente al realizar el análisis estadístico por textura (Apéndice I), para facilitar la interpretación de resultados, se observa que la mortalidad natural de larvas en el tratamiento control fue baja, sin un aumento significativo en el tiempo. Sin embargo, en el tratamiento con suelo de textura arenosa se registró mayor mortalidad, aunque no superó el 20% (Figura 10).

Por otro lado, después de ser aplicadas las tres concentraciones de *Steinernema* sp. sobre suelos de textura arenosa (a) y franca (F), éstas causaron mortalidad final de alrededor de 80 - 100%, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos.

En el suelo arcilloso (A) se registró la mayor mortalidad de *G. mellonella* (75 - 100%), cuando se utilizaron las concentraciones de NEP más altas, 2.200 y 4.400 NEP/ tubo (equivalente a 50 y 100 JI cm<sup>-2</sup>). La menor concentración, 440 NEP/tubo (equivalente 10 JI cm<sup>-2</sup>), resultó ser significativamente diferente (P<0,05) a la mayor concentración, obteniendo menos de 40% de mortalidad de larvas acumulada al día 9 (Figura 10).

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se determinó que la concentración adecuada para la realización del Experimento 2 fue de 100 JI cm<sup>-2</sup> (4.400 NEP/tubo), ya que permitió asegurar una elevada mortalidad de larvas en las tres texturas de suelo después de nueve días de aplicados los NEP a una profundidad de 20 cm de la superficie del tubo.

### **Velocidad de ataque de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en distintas texturas de suelo y concentraciones**

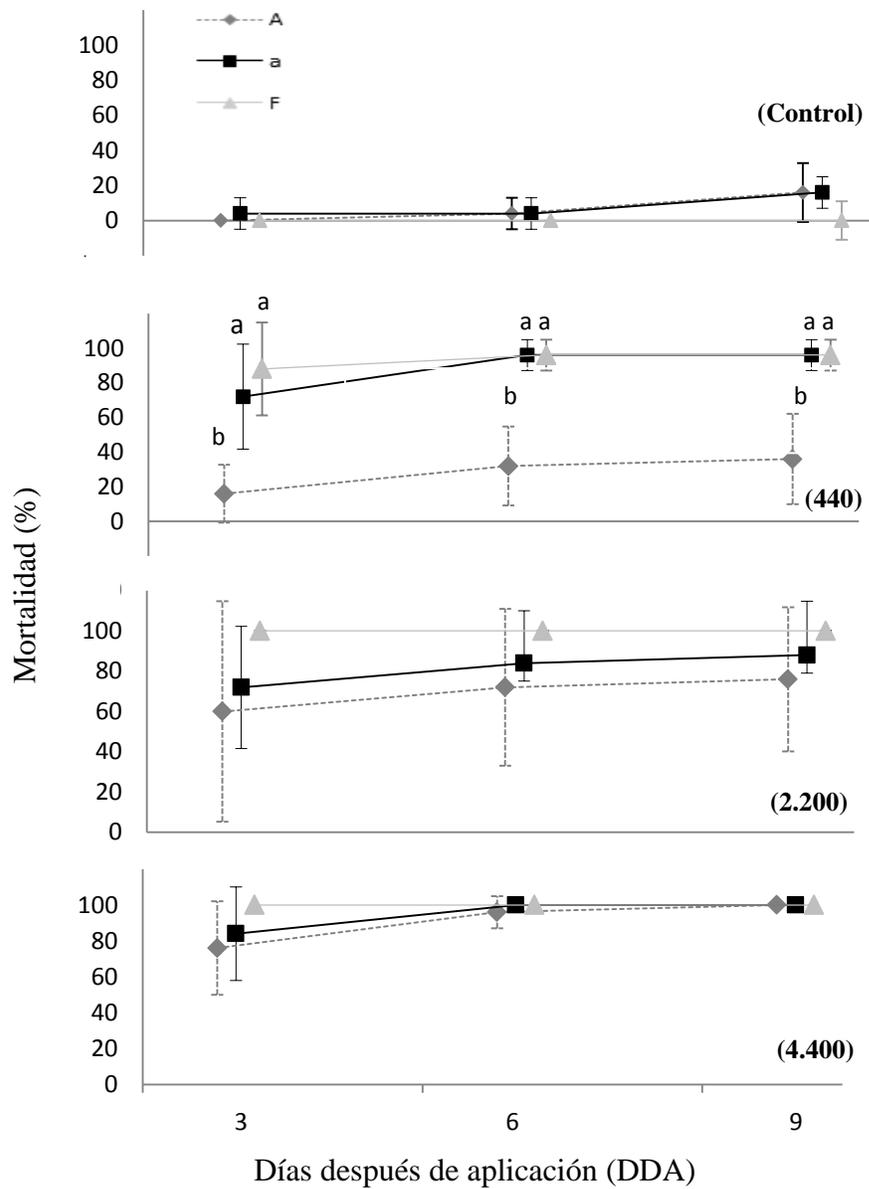
En la Figura 11 se observa que al no incorporar NEP, la mortalidad a los 9 días no superó un 20%. Sólo en la concentración 440 se registraron diferencias significativas, entre las texturas al ser analizadas por fecha.

Al utilizar la concentración menor de *Steinernema* sp. (10 JI cm<sup>-2</sup>, 440 NEP/tubo), a los 3 DDA, en suelo franco se obtuvo más de 80% de mortalidad y en arenoso 70%. A su vez, en suelo arcilloso, la mortalidad fue menor a 20%. Sin embargo, a los 6 DDA, en los suelos arenoso y franco todas las larvas murieron, y al 9 DDA, la mortalidad en el suelo arcilloso fue menor, con un valor menor al 40%, siendo significativamente distinto en las tres fechas de medición (Figura 12).

Cuando se incorporó la concentración media (50 JI cm<sup>-2</sup>; 2.200 NEP/tubo), se obtuvo 100% de mortalidad a los 3 DDA, en suelo franco, en tanto en los suelos arcilloso y arenoso, los NEP lograron una mortalidad 70-80%, incrementándose levemente al 9 DDA, pero sin alcanzar 100% de mortalidad. Los resultados entre estos tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Al emplear las mayores concentraciones (100 JI cm<sup>-2</sup>; 4.400 NEP/ tubo), en las tres texturas de suelo a los 3 DDA, se logró un nivel de mortalidad mayor al 70%, siendo levemente menor en el suelo arcilloso, sin presentar diferencias significativas.

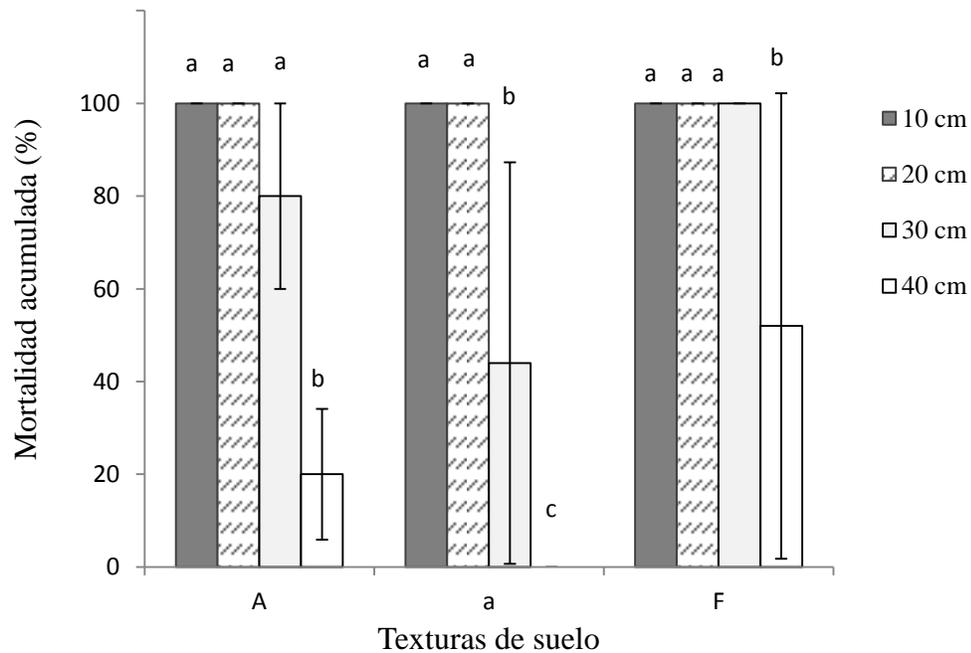
Al utilizar las dos concentraciones mayores, no hubo diferencias significativas entre los distintos suelos, sin embargo, en suelo franco los NEP lograron una mayor mortalidad promedio que en los otros suelos.



**Figura 11.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* medida los 3, 6 y 9 días después de aplicados: 0; 440; 2.200; y 4.400 NEP/ tubo en los suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F). Las diferencias significativas se indican con letras diferentes en los puntos correspondientes a una misma fecha de medición ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba Tukey. Para facilitar la visualización de datos, los valores de x para suelos de textura arenosa y franca, se desplazaron -0,2 y + 0,2 unidades respectivamente del valor original (3, 6, 9).

### Desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura

A partir del análisis estadístico se estableció que existe interacción entre los factores ( $P=0,019$ ) (Apéndice I), es decir, se observa un efecto combinado de la textura y la distancia horizontal desde el punto de aplicación *Steinernema* sp. después de 9 días, en la muerte de larvas de *G. mellonella*, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (Figura 12).



**Figura 12.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* ubicadas a 10, 20, 30 y 40 cm, horizontalmente del punto de aplicación de *Steinernema* sp. en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F). Letras distintas sobre las barras, correspondientes a un mismo tipo textural, representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba Tukey.

Al realizar el análisis estadístico por textura (Apéndice I), se determinó que la capacidad de desplazamiento de *Steinernema* sp. hasta los 20 cm. no presenta dificultades en las tres texturas de suelo. Por su parte, en el suelo de textura arcillosa, los NEP fueron capaces de desplazarse hasta 30 cm sin presentar diferencias significativas con las distancias menores, ocasionando una mortalidad promedio de larvas de 80%. A los 40 cm de distancia, la capacidad de desplazamiento fue menor, obteniendo una mortalidad alrededor de 20%, siendo significativamente distinto al resto de los tratamientos.

La capacidad de desplazamiento de *Steinernema* sp. a partir de los 30 cm comienza a presentar dificultad en el suelo arenoso, donde se obtuvo una menor mortalidad de larvas, presentando diferencias significativas con las distancias menores. Cuando la placa Petri se encontraba a 40 cm no se observó mortalidad.

Finalmente, en suelo franco, los NEP actuaron de la misma forma que en suelo arcilloso, se desplazaron con facilidad hasta los 30 cm, provocando 100% de mortalidad de larvas. Pero a 40 cm la mortalidad de larvas disminuyó, un 50% promedio, observándose una disminución de su efectividad a esta distancia. En este tratamiento se obtuvo una alta variabilidad en los resultados, esto se debe principalmente a que algunas repeticiones tuvieron altas mortalidades, es decir, los NEP lograron un 100% de mortalidad en larvas de *G. mellonella*, y en otras no al día 9. Algo similar ocurre en suelos arenosos a los 30 cm.

### **Velocidad de infección de *Steirnerema* sp. aislamiento Licán Ray a diferentes distancias horizontales y texturas de suelo**

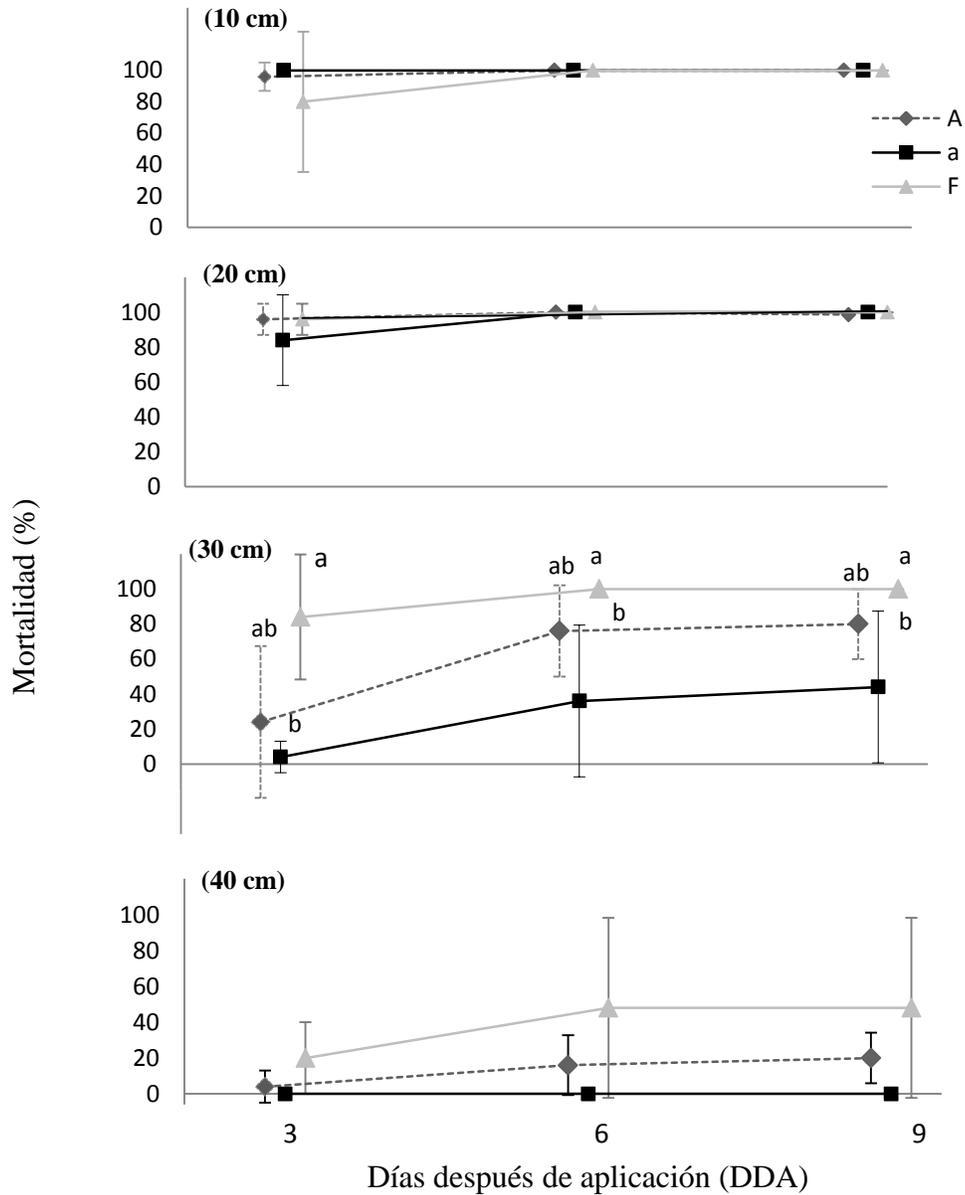
En la Figura 13 se observa que *Sterneinema* sp. llega fácilmente al hospedero ubicado a 10 cm a los 3 días en todos los suelos, provocando 80 - 100% de mortalidad promedio, sin existir diferencias significativas entre las texturas de suelo.

Al incrementar la distancia a 20 cm del hospedero, se observan resultados similares a los 3 DDA. En este caso, *Steirnerema* sp. provocó un 80-100% de mortalidad en todos los suelos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

A medida que aumenta la distancia horizontal desde el punto de aplicación, la velocidad de llegada de NEP a las larvas es afectada por la textura de suelo. Cuando el hospedero se encuentra a 30 cm, *Steirnerema* sp. en suelo arenoso no llega al hospedero dentro de los primeros 3 días. En este lapso de tiempo, en suelo arcilloso provocan un 20% de mortalidad promedio y en suelo franco este parámetro aumenta notablemente, alcanzando 80%. A los 6 y 9 DDA, aumenta levemente la mortalidad de larvas en suelos arcilloso y arenoso. En suelo franco los NEP causan 100% de mortalidad, pero en suelo arenoso bajó su capacidad infectiva, logrando menos de un 40% de muerte de larvas hospederas. Sólo a esta distancia se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

A los 40 cm, se observa que los NEP tienen dificultades para lograr la mortalidad de las larvas hospederas, observándose 20% y 40% de mortalidad al día 9 en suelos arcilloso y franco, respectivamente. Sin embargo, en suelo arenoso no se observó mortalidad de larvas de *G. mellonella* (L.).

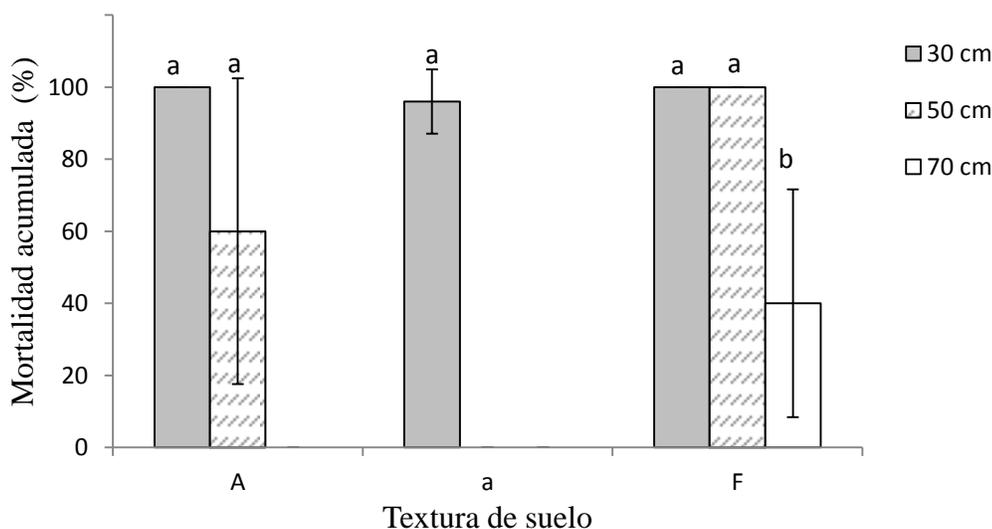
Cabe destacar que *Steirnerema* sp. es capaz de desplazarse horizontalmente hasta los 40 cm sólo en suelo franco y provocar más de un 30% de mortalidad de larvas. Pero, sin duda tienen mayor eficacia entre 10 a 20 cm en las tres texturas de suelo (Figura 13).



**Figura 13.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* a los 3, 6 y 9 días después de la aplicación de NEP en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F) a distancias de 10, 20, 30 y 40 cm horizontalmente. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes en los puntos correspondientes a una misma fecha de medición ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba Tukey. Para facilitar la visualización de datos, los valores de x para suelos de textura arenosa y franca, se desplazaron -0,2 y + 0,2 unidades respectivamente del valor original (3, 6, 9).

### Desplazamiento vertical de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en suelos de diferentes texturas

A partir del análisis estadístico se estableció que existe interacción entre los factores ( $P=0,0$ ) (Apéndice I), es decir, se obtuvo un efecto combinado de la textura y la distancia vertical desde el punto de aplicación de *Steinernema* sp. después de 9 días, en la muerte de larvas de *G. mellonella*, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.



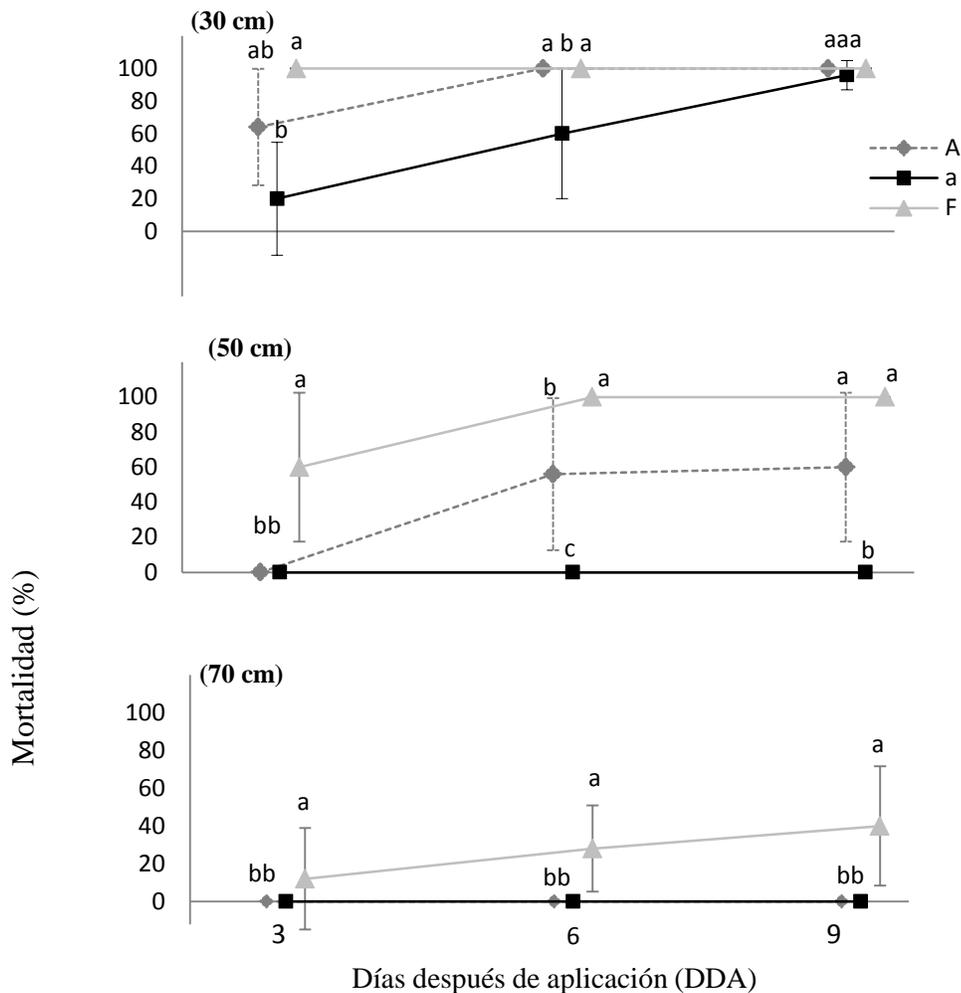
**Figura 14.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* ubicadas verticalmente a 30, 50 y 70 cm de *Steinernema* sp. en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F). Letras distintas sobre las barras, correspondientes a un mismo tipo textural, representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

Luego de realizado el análisis por textura (Apéndice I), se determinó que los NEP tienen mayor capacidad infectiva, cuando la placa Petri con hospederos se encuentra a una menor profundidad dentro de la arena experimental en todos los suelos. Los JI se trasladaron 30 cm en las tres texturas de suelo, arcillosa, franca y arenosa, debido a que la mortalidad acumulada en estos tratamientos fue de 90 a 100%. Cuando la placa Petri fue localizada a 50 cm del punto de aplicación, en los suelos arcilloso y franco, los nemátodos causaron mortalidad sin presentar diferencias significativas con los tratamientos a 30 cm. Sin embargo, en el suelo arenoso, no hubo evidencia de llegada de NEP, siendo más difícil la llegada a los hospederos en este tipo de suelo (Figura 14).

A los 70 cm la capacidad de desplazamiento disminuyó notablemente en todos los suelos. Cabe destacar que los JI fueron capaces de infectar a los hospederos sólo en suelo franco, causando un 40% de mortalidad de larvas, pero con una alta variabilidad en los resultados obtenidos.

### Velocidad de infección de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray a diferentes profundidades y texturas de suelo

*Steinernema* sp., obtuvo una alta velocidad de desplazamiento hasta los 30 cm. de profundidad a través del suelo franco, provocando 100% de mortalidad a los 3 DDA. A su vez, en suelo arcilloso, se desplazó y causó 60% de mortalidad promedio, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre éstos. Sin embargo, en suelo arenoso se registró solamente 20% de mortalidad, siendo los NEP más lentos en este sustrato que en suelo franco. A los 6 DDA, en suelo arcilloso los NEP causaron 100% de mortalidad, pero en arenoso sólo al 9 DDA se logró parasitar la totalidad de las larvas hospederas (Figura 15).



**Figura 15.** Mortalidad acumulada (% promedio  $\pm$  desviación estándar) de *G. mellonella* a los 3, 6 y 9 días después de la aplicación de NEP en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F) a distancias de 30, 50 y 70 cm verticalmente. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes en los puntos correspondientes a una misma fecha de medición ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba Tukey. Para facilitar la visualización de datos, los valores de x para suelos de textura arenosa y franca, se desplazaron -0,2 y + 0,2 unidades respectivamente del valor original (3, 6, 9).

Cuando la placa Petri se ubicó a 50 cm de profundidad en la arena experimental, los NEP infectaron al hospedero a los 3 DDA solamente en suelo franco, obteniendo un 0% de larvas muertas en los demás suelos. Posteriormente, a los 6 DDA, los NEP provocaron 100% de mortalidad de larvas en suelo franco, 60% en arcilloso y no hubo muerte en arenoso, presentando diferencias significativas en las tres texturas. Al 9 DDA, la mortalidad correspondiente a cada tratamiento no cambia de manera importante, y se observa sólo un leve aumento en mortalidad, que provocó que suelos arcillosos y francos no tuvieran diferencias.

Cuando la placa Petri se ubicó a una profundidad de 70 cm en la arena experimental, el desplazamiento de los NEP se vio afectado, y los JI recorrieron esta distancia sólo en suelo franco, alcanzando en este lapso de tiempo 40% de mortalidad de las larvas hospederas al noveno DDA.

En definitiva, en el suelo franco, *Steinernema* sp. posee una mayor velocidad y capacidad de desplazamiento vertical.

## DISCUSIÓN

La actividad de *Steirnerema* sp. aislamiento Licán Ray, especialmente su capacidad de llegar al hospedero y parasitarlo, fue afectada por la textura del suelo, bajo condiciones de humedad y temperatura controladas. Esto coincide con investigaciones de otros autores, que comprobaron un efecto de la textura en la eficacia de distintos NEP. Por ejemplo, Shapiro-Ilan *et al.* (2000) evaluó *Steirnerema riobrave* y *Heterorhabditis bacteriophora* parasitando *Diaprepes abbreviatus* (L.) en suelos arenosos y arcillosos y Toepfer *et al.* (2010) establecieron que *H. bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis* (Poinar) y *Steirnerema feltiae* ejercían mayor control sobre *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) en suelos de arcilla y limo que en suelos arenosos.

### Concentraciones de *Steirnerema* sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura

Actualmente existen pocos estudios que establecen las concentraciones adecuadas de NEP que se deberían utilizar en suelos de diferente textura. La mayoría de los estudios disponibles en la literatura determinan la concentración en campo de diferentes cepas de NEP, enfocándose principalmente en la plaga que se desea controlar. Además, se puede encontrar trabajos que evalúan el efecto de la textura considerando el insecto específico, aplicando una concentración de NEP única.

Por ejemplo, Yan *et al.*, (2012) concluyeron que para lograr un control total de *Phyllotreta striolata* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae) en campo, es necesario utilizar concentraciones mayores a 22 JI cm<sup>-2</sup> de *S. carpocapsae* y *H. indica*. Otros estudios sugieren que se necesitan concentraciones entre 25 - 100 JI cm<sup>-2</sup> de *S. carpocapsae* para la supresión exitosa de *D. abbreviatus* (Shapiro-Ilan *et al.* 2000). Por su parte, Gazit *et al.* (2000), determinaron que el control de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) era más eficaz en arena aplicando 150 JI cm<sup>-2</sup> de *S. riobrave* y Loya y Hower (2002), utilizaron mayores concentraciones, 25.000, 70.000 y 150.000 cm<sup>-2</sup> de *H. bacteriophora* en el control de *Sitona hispidulus* (Coleoptera: Curculionidae) en campos de alfalfa, sin encontrar diferencias significativas entre estos tratamientos. Así mismo, Batista *et al.* (2014) evaluaron dos concentraciones en maceta (2.000 y 4.000 JI ml<sup>-1</sup>) para *Mahanarva spectabilis* (Distant) (Hemiptera: Cercopidae) utilizando *S. riobrave*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* (Andaló) y *S. carpocapsae*, sin encontrar diferencias significativas entre las concentraciones. También Leite *et al.* (2007) encontraron que tratamientos de larvas de *Mabiusi bradysia* (Lane) (Diptera: Sciaridae) con *H. indica*, en invernadero y en concentraciones de 5,7 y 22,6 JI cm<sup>-2</sup> no mostraron diferencias, alcanzando una mortalidad de 75% y 85%, respectivamente.

En relación a los estudios que evalúan una concentración única en suelos de distinta textura, Shapiro-Ilan *et al.* (2011) evaluaron la infectividad de sobre *Conotrachelus*

*nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) aplicando 500 JI/maceta en arenas experimentales con suelo franco y franco arcilloso. Los resultados mostraron altos niveles de mortalidad en ambos suelos, lo que coincide con los resultados del presente trabajo, ya que *Steirnerema* sp. aislamiento Licán Ray, causó mortalidad similar, cercana al 100%, en suelo arcilloso, franco y arenoso, al utilizar altas concentraciones de NEP (sobre 50 JI cm<sup>-2</sup>).

Por otro lado, múltiples trabajos han registrado variabilidad en la virulencia de cepas de NEP en suelos de distinta textura, donde no siempre suelos livianos entregan las mejores condiciones para el desplazamiento y actividad de JI. Por ejemplo, Eben y Barbercheck (1997) observaron mayor eficiencia de *S. carpocapsae* en suelo franco arenoso que en arenoso. Así mismo, Lezama-Gutiérrez (2006) encontró que esta misma cepa fue más eficaz en suelos de textura franca que en suelos arenosos o arcillosos, y *S. riobrave* se comportó de manera similar en suelos de textura franca y franco arenosa. También, Shapiro- Ilan *et al.* (2000), determinaron que *S. riobrave* y *H. bacteriophora* exhiben mayor virulencia sobre *D. abbreviatus* y mayor persistencia en suelos con alto contenido de limo y arcilla, en comparación con suelos arenosos y Koppenhöfer y Fuzy (2006) comprobaron que la infectividad de *S. gloseri* (Steiner), *H. zealandica* (Poinar) y *H. bacteriophora* no se vio afectada por la textura de suelo y que la única especie que mostró disminución en la infectividad fue *S. scarabaei*.

Esta variabilidad en la infectividad de las distintas especies o cepas de NEP pueden deberse a los múltiples factores que influyen en la capacidad infectiva de los NEP, como la temperatura y humedad del suelo, características del hospedero, el comportamiento de búsqueda, propio de cada especie de NEP y la presencia de enemigos naturales, entre otros (Kaya, 1990; Koppenhöfer y Kaya, 1996), más aún si se encuentra en condiciones de campo.

Es importante mencionar que en el presente estudio, al utilizar las menores concentraciones de *Steirnerema* sp. (10 JI cm<sup>-2</sup>) en suelos de textura arcillosa, la mortalidad de las larvas hospederas fue significativamente inferior a la que se logró al utilizar las concentraciones más altas (100 JI cm<sup>-2</sup>). Según algunos autores (Barbercheck y Kaya 1991; Gouge *et al.* 2000; Hazir *et al.* 2004), esto podría deberse a que, al aplicar un número reducido de NEP, éstos no son capaces de desplazarse por distancias mayores, como en el caso de este estudio, donde la placa Petri con las larvas hospederas se ubicaba a una profundidad de 20 cm. Los suelos arcillosos presentan poros de menor tamaño de poros, lo que muchas veces genera dificultades en el movimiento de oxígeno, impidiendo que los NEP lleguen a su hospedero fácilmente o a que en la búsqueda del hospedero agotan su limitada energía de reserva (Del Valle *et al.* 2008). Por ejemplo, Lezama-Gutiérrez *et al.* (2006) observaron que la mortalidad causada por *S. carpocapsae* sobre el último instar de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) fue mayor en suelos con un alto contenido de arena y que en arcillas este valor disminuyó significativamente. Sin embargo, destacan que hubo un efecto positivo de la concentración en todos los tipos de suelo.

En relación a la velocidad de infección de los NEP en suelos de distinta textura, varios autores han observado que suelos más pesados dificultan la llegada del NEP al hospedero (El-Borai *et al.*, 2012). En el presente trabajo, la mortalidad causada por 10 JI cm<sup>-2</sup> de

*Steinernema* sp. en suelo franco y arenoso, fue de alrededor de 100% a los 3 días, pero en suelo arcilloso este valor alcanzó solamente 20%, en el mismo periodo, aumentando menos de un 10% al día 9. Sin embargo, al utilizar 50 y 100 JI cm<sup>-2</sup>, en los tres tipos de suelo se observó una mortalidad cercana al 100% a los 3 días. Leite *et al.*, (2007) observaron algo similar en su trabajo, donde la mortalidad de *Bradysia mabiusi* (Lane) (Diptera: Sciaridae), causada por la aplicación de 5,7 y 22,6 JI cm<sup>-2</sup> de *H. indica* fue de 67 y 80%, respectivamente, 24 horas después de la aplicación. Este nivel de mortalidad no aumentó más de 6% después de 15 días. Asimismo, Gazit *et al.* (2000) observaron que la infectividad de *S. riobrave* sobre *C. capitata*, en el suelo, fue máxima a los 3 días, disminuyendo drásticamente a los 10 días, y después de 14 días no se registró mortalidad. Sin embargo, la mortalidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) causada por *S. riobrave* en suelo franco arcillo-limoso fue mayor a los 12 días (36%) que a los 6 días (6%) (Cabanillas y Raulston 1994).

Otro factor influyente en la eficacia de NEP, es el comportamiento de búsqueda de éstos, es decir, su tendencia a ser emboscadores o navegantes. La mayoría de las especies se encuentran entre estos dos extremos, teniendo una estrategia de búsqueda intermedia, como *S. riobrave*, y *S. feltiae* (Campbell *et al.*, 2003). Los resultados del presente trabajo sugieren que el aislamiento utilizado tiene la capacidad de buscar su hospedero, llegando a una profundidad de 20 cm en suelos de todas las texturas evaluadas, asemejándose a *Steinernema riobrave* en el control de *Helicoverpa zea* (Boddie), a 20 cm (Cabanillas y Raulston 1994) y *Heterorhabditis baujardi* (Poinar) causando alta mortalidad del hospedero ubicado a los 10 cm, en condiciones de campo. En todos los casos, la profundidad alcanzada por los JI favorece el control de insectos plaga, ya que algunos pasan una parte de su ciclo de vida en la primera capa del suelo (Del Valle *et al.*, 2008).

Gazit *et al.* (2000) plantean que un sistema de control biológico de plagas basado en NEP requiere no sólo de una cepa eficaz, sino también de mantener su infectividad en el suelo bajo una amplia gama de condiciones ambientales en que habita la plaga. Teniendo en cuenta esto, en la presente investigación se observó que *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray redujo en 90 - 100% el número de larvas de *G. mellonella* en condiciones controladas de temperatura y humedad en suelos livianos, utilizando concentraciones de 10, 50 y 100 JI cm<sup>-2</sup>. No así en suelo arcilloso, donde sólo aplicando concentraciones elevadas de NEP se logró la máxima mortalidad. Estudios futuros deberían llevar estos ensayos a campo, considerando variables climáticas, ecológicas y agronómicas que influyen en la capacidad infectiva de los distintos aislamientos.

### **Desplazamiento de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura**

La textura de suelo y la distancia, tanto vertical como horizontal, NEP-*G. mellonella* (L), afectaron significativamente la eficacia de búsqueda del nemátodo, existiendo una relación inversa entre la distancia NEP-hospedero y la mortalidad de larvas, en todos los tipos de suelo. Estudios previos de Georgis y Poinar (1983) y Portillo-Aguilar *et al.* (1999)

reportaron que *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* y *S. glaseri*, mostraron mayor capacidad de desplazamiento en suelo franco arenoso que en suelos franco o franco arcillo limoso.

Respecto al desplazamiento vertical, cuando las larvas de *G. mellonella* se encontraban a una profundidad de 30 cm, los NEP fueron capaces de alcanzarlas, provocando altas mortalidades. Resultados similares los obtuvieron Sáenz y Olivares (2008) al evaluar la eficacia de *Steinernema* sp., de comportamiento intermedio, en suelos de textura, franco arcillosa y franco arenosa, en condiciones de invernadero. Sus resultados indican que los NEP llegaron a todas las profundidades, 7, 14 y 21 cm. No obstante, la velocidad de desplazamiento fue menor en la textura franco arcillosa, contrario a los resultados del presente estudio, donde el suelo arenoso se registró mayor demora en provocar 100% de mortalidad de larvas.

Georgis y Poinar (1983), evaluaron la capacidad de desplazamiento vertical, hasta 10 cm, de *Steinernema gloseri* en suelos arenosos, franco arenosos, franco arcillo limosos y arcillas. Sus resultados revelan una dificultad de desplazamiento del nemátodo en suelos con mayor proporción de arcilla y limo, llegando sólo hasta una profundidad de 6 cm. Además, los autores indican que los NEP se desplazaron más al estar presentes las pupas del insecto hospedero. Si bien es cierto, en los resultados obtenidos en la presente investigación, a 30 cm de profundidad no existen diferencias significativas en cuanto a la mortalidad en todos los tipos de suelo, cuando se aumentó la distancia vertical a 50 y 70 cm desde el punto de aplicación de los NEP, su desplazamiento mayor en los suelos franco y arcilloso, ya que provocaron mortalidad de larvas, lo que prácticamente no se observó en suelo arenoso, al contrario de lo observado por Georgis y Poinar (1983).

Algo similar ocurrió al evaluar la capacidad de desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp., ya que después de los 30 cm en suelos arcilloso y franco se vio afectada la capacidad infectiva. No así en suelo arenoso, donde sólo hasta los 20 cm se observó alta mortalidad. Ansari *et al.* (2008) evaluaron el desplazamiento horizontal en arena a 5, 10, 15 y 20 cm de *Heterorhabditis bacteriophora* en el control de *Hoplia philanthus* (Fuesslin) (Coleoptera: Scarabaeidae) bajo invernadero. Ellos observaron una correlación inversa entre la distancia desde el hospedero y la mortalidad, obteniendo mayores mortalidades en los primeros 10 cm de suelo, lo que coincide con nuestros resultados. Sin embargo, Del Valle *et al.* (2008) observaron resultados diferentes, donde *Heterorhabditis baujardi* mostró una capacidad de desplazarse horizontalmente hasta 90 cm desde el punto de aplicación en condiciones de campo.

En relación a la velocidad de desplazamiento, Georgis y Hague (1981), observaron que *S. carpocapsae* se desplazó 7 cm en 5 días en suelos de bosque esterilizado, lo que se traduce en una tasa de 1,4 cm/día. Por su parte, Moyle y Kaya (1981), determinaron que esta especie se trasladaba 4 cm en 2 días en arena. Además, observaciones realizadas por Poinar y Hom (1986) determinaron una tasa de 4,35 cm/día en campos de suelo franco-arcilloso. En el presente trabajo se observó un desplazamiento de *Steinernema* sp. de 10 cm en 3 días en todos los suelos. Sin embargo, al aumentar la distancia al hospedero, hubo diferencias en la velocidad. Por ejemplo, a los 20 cm sólo en el suelo arenoso el NEP demoró más, tardando 6 días en provocar un 100% de mortalidad. A su vez, a los 30 cm en suelo franco y arcilloso demoraron 6 días y en suelo arenoso no logró el 40% de mortalidad. Finalmente,

a los 40 cm no se registró alta mortalidad en ningún suelo, alcanzándose un 40% a los 9 días.

Otros estudios reportados en la literatura muestran resultados diferentes, donde una densidad alta de partículas de suelo, afecta el desplazamiento y sobrevivencia de NI, por el reducido tamaño de poros, donde el diámetro del NEP es mayor respecto al tamaño de poro o las concentraciones de oxígeno disminuyen, provocando la muerte del NEP (Kaya, 1990; Georgis y Gaugler 1991; Portillo- Aguilar *et al.*, 2000). Sin embargo, existe acuerdo entre el presente estudio y el de Toepfer *et al.* (2010), donde la mortalidad en maceta de *Diabrotica virgifera virgifera* causada por *H. bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis* y *S. feltiae* fue mayor en arcilla y limo que en arena. Ellos plantean que los nemátodos pueden encontrar con mayor rapidez a su hospedero en suelos arcillosos al desplazarse a través de las grietas formadas por las raíces de las plantas o larvas al desplazarse. En arena, sin embargo, las partículas se dispersan de manera más equitativa y el movimiento neto de los NEP hacia las larvas hospederas puede, por tanto, ser menos dirigido. También Wallace (1958) concuerda al postular que en suelos de texturas finas, las partículas más pequeñas se unen para formar agregados grandes, de manera que la estructura del suelo se vuelve más importante que la composición del tamaño de partículas, para determinación de la eficacia de NEP. Por ejemplo, en un trabajo de Mac Millan *et al.* (2009), los NEP se desplazaron mejor en suelos franco-arcillosos que en franco-arenosos. Lo mismo ocurrió en el presente trabajo, donde los suelo arcilloso y franco mostraron una tendencia a formar agregados más grandes y estables, formándose macroporos de mayor tamaño, al momento de incorporar el suelo a los tubos. Así, se generaron vías potenciales de dispersión a través de éste, siendo menos tortuosas, y logrando que los NEP alcanzaran en un menor tiempo el insecto hospedero y gastaran menos energía para navegar que los en suelo arenoso

Por su parte, Koppenhöfer y Fuzy (2006) observaron que *S. glaseri*, de gran tamaño, *H. zealandica*, de tamaño intermedio (27x685µm) y los pequeños *H. bacteriophora*, no se vieron afectados por la textura del suelo, y el único NEP que mostró una débil y variable disminución de la infectividad en suelos más finos fue *S. scarabaei* de tamaño intermedio (31x918 µm). Esto se debió principalmente a que el efecto de la textura, se confundió con otros factores que influyeron la capacidad infectiva, ya que el ensayo se realizó en invernadero. Mwaniki *et al.* (2010) indicaron que *S. kariii* (Andaló, Nguyen y Moino) no presentó diferencias en distintos tipos de suelo y *H. indica* mostró una infectividad mayor en suelos arcillosos que en los arenosos. En cuanto a la sobrevivencia en los distintos sustratos, para *S. kariii* ésta fue más alta en suelos arcillosos y para *H. indica* en suelos arenosos. Los autores plantean que cada NEP tiene su patrón de comportamiento en el suelo, aquellos con alto porcentaje de arena son más aireados y son ideales para la sobrevivencia de NEP, pero los suelos arcillosos pueden retener humedad por más tiempo, por lo tanto también permite una mejor sobrevivencia de los mismos (Koppenhöfer y Fuzy, 2006).

La humedad es un factor determinante en el desplazamiento de NEP a través del suelo, debido a que requieren de una película de agua en los espacios intersticiales para su movimiento efectivo. Es por esto que al volverse demasiado delgada o nula, se restringe la llegada al insecto hospedero (Koppenhöfer, 1996; Grewal *et al.*, 2005). En base a esto, una de las razones que podrían haber influido en la variabilidad de los resultados del presente

trabajo es el movimiento de agua a través de la arena experimental. Si bien, todos los suelos utilizados estaban a capacidad de campo, en suelo arenoso es probable que la baja capacidad de retención de agua (Casanova *et al.* 2006) haya afectado el encuentro de NEP con su hospedero, ya que la película de agua después de unos días se puede haber vuelto muy delgada impidiendo el desplazamiento cuando la placa Petri se encontraba a una mayor distancia, tanto horizontal como vertical.

Un aspecto importante que se debe considerar es que las reservas energéticas en los JI son limitadas, y cuanto mayor sea la distancia que deben desplazarse, mayores son las posibilidades de agotar estas reservas, dificultando la oportunidad de llegar al hospedero adecuado, o debido a su debilidad, impidiendo infectar con éxito al insecto (Del Valle *et al.* 2008).

Una de las características intrínsecas de los NEP que es importante considerar al momento de escoger una cepa para el control de una determinada plaga es su comportamiento de búsqueda (Koppenhöfer y Fuzy, 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos, *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, se asocia a un hábito navegante o mixto, debido a que es capaz de desplazarse horizontalmente hasta 40 cm y verticalmente 70 cm hasta su hospedero, en este caso de *G. mellonella*.

Estudios previos en el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Chile, establecieron mediante antecedentes morfológicos que *Steinernema* sp. podría corresponder a una nueva especie o estar asociada *Steinernema weiseri* o *S. feltiae*, siendo la segunda de comportamiento intermedio de búsqueda (Lewis *et al.*, 2006), ajustándose a nuestros resultados. Para determinar a cuál especie pertenece o si se trata de una nueva, es necesario realizar pruebas de hibridación cruzada, lo que escapa a los objetivos de este estudio (Flores, 2012).

Este aspecto hace al NEP estudiado un buen candidato para el control de plagas de hábito críptico, aquellas que se refugian en el suelo o en estructuras vegetales y estudios posteriores nos podrán dar más detalles en relación al comportamiento exacto de este aislamiento. Por ejemplo, Batista *et al.* (2014) evaluó la infectividad de varias cepas y sólo *S. riobrave* generó un mayor porcentaje de mortalidad en *Mahanarva spectabilis* en maceta. Los autores atribuyen este resultado a su capacidad de desplazarse en suelo, con un promedio de 4 cm/día, corroborando su comportamiento de búsqueda navegante.

Este trabajo da una primera luz en relación al comportamiento de la especie estudiada en suelos de distinta textura. Sin embargo, existen múltiples factores que pueden afectar la efectividad del nemátodo, como por ejemplo, pH, materia orgánica y concentración de nutrientes del suelo, los que interactúan y generan efectos positivos o negativos en la capacidad infectiva del NEP (Jaworska *et al.*, 1999). Los cuales fueron no estudiados, ya que no eran parte de esta investigación.

Muchas veces los resultados bajo condiciones de laboratorio cambian al realizar los estudios bajo condiciones de campo (Koppenhöfer y Fuzy, 2006). Una manera de continuar este estudio será realizar las mediciones en relación a la textura del suelo y la capacidad infectiva de los NEP en campo, ya que es allí donde interactúan todos los factores que

determinan la capacidad infectiva de las distintas especies de NEP. También sería importante conocer el movimiento y la ubicación de los JI en el perfil de suelo, ya que los agentes controladores y los insectos plaga deben coincidir tanto en tiempo como en espacio para asegurar el éxito de los NEP como agentes de control biológico.

## CONCLUSIONES

Concentraciones elevadas del NEP nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, causan alta mortalidad en larvas de *G. mellonella* (L.) en suelos de textura arenosa, franca y arcillosa pero la textura del suelo influye en la velocidad de infección.

La textura de suelo y las distancias que debe recorrer el nemátodo, tanto vertical como horizontalmente desde el punto de aplicación hasta el insecto hospedero, afectan la capacidad de infección *Steinernema* sp., siendo las texturas medias las que favorecen más su desplazamiento.

El aislamiento utilizado fue capaz de desplazarse en los suelos de diferente textura, cubriendo mayores distancias de manera vertical (70 cm) que horizontal (40 cm), por lo que se puede considerar de hábito navegante o mixto.

**LITERATURA CITADA**

- Ansari, M.; M. Hussain and M. Moens. 2008. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthus* in turfgrass. Wiley Interscience, 368-374.
- Barbercheck, E. and H. Kaya. 1991. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditidae: Steinernematidae). Environment Entomology, 20: 538–589.
- Batista, E.; A. Auad; V. Andaló; M. Monteiro. 2014. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) to spittlebug *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). Plant Parasitology, 145-149.
- Bruck D.; Shapiro-Ilan D.; and D. Lewis. 2005. Evaluation of application technologies of entomopathogenic nematodes for control of the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*. Journal of Economic Entomology, 98:1884-1889.
- Cabanillas, E. and R. Raulston. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. Journal of Nematology, 26: 25–31.
- 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: 156–169.
- Campbell, F.; E. Lewis; P. Stock; S. Nadler and H Kaya. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. Journal of Nematology, 35: 142-145.
- Campos-Herrera, R. and C. Gutiérrez. 2014. *Steinernema feltiae* intraspecific variability: infection dynamics and sex-ratio. Journal Nematology, 46 (1): 35-43.
- Casanova, M.; W. Vera y W. Luzio. Rasgos morfológicos de los suelos (cap. 2, pp. 57 -63). En: Luzio, W. y M. Casanova (ed.). Avance en el conocimiento de suelos de los Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 399p.
- CIREN (Centro de Información de Recursos Naturales), Chile. 1996. Estudio agrológico Región Metropolitana, descripciones de suelos materiales y símbolos. Santiago, Chile: CIREN. 425p.
- Cutler, C. and M. Webster. 2003. Host-finding ability of three entomopathogenic nematode isolates in the presence of plant roots. Journal Nematology, 5: 601-608.

Del Valle E.; C. Dolinski y R. Souza. 2008. Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *International Journal of Pest Management*, 54: 115–122.

Duncan, W.; D. Shapiro; C. Mc Coy and J. Graham. 1999. Entomopathogenic nematodes as a component of citrus root weevil IPM. (cap. 1, pp. 69-78). In: Polavarapu, S. (ed.) S. Polavarapu. Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. New Jersey, EE.UU: Rutgers University. 102p.

Eben, A. and M. Barbercheck. 1997. Host Plant and Substrate Effects on Mortality of Southern Corn Rootworm from Entomopathogenic Nematodes. *Biological Control*, 8: 89–96.

Edgington, S.; Buddie; A.G. Moore; D., France; A., Merino; L. Tymo and D. Hunt. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Journal Nematology*, 12: 915-928.

El-Borai, F; R. Stuart; R. Campos-Herrera; E. Pathak and L. Duncan .2012. Entomopathogenic nematodes, root weevil larvae, and dynamic interactions among soil texture, plant growth, herbivory, and predation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109:134–142.

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. 54p.

Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 24: 351–360.

Gazit, Y.; Y. Rössler and I. Glazer. 2000. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science. Technology*, 10: 157–164.

Georgis, R. and N. Hague. 1981. A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphiliidae). *Annals of Applied Biology*, 99: 171-177.

Georgis, R. and G. Poinar. 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal Nematology*, 15: 308–315.

Georgis, R. and R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 15: 713-720.

Gouge, H.; K. Smith; L. Lee and T. Henneberry. 2000. Effect of soil depth and moisture on the vertical distribution of *Steinernema riobrave* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal Nematology*, 32: 223–228.

Grewal, P.; Ehler; S. and D. Shapiro-Ilan. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing, CABI International. London, UK. 513p.

Hazir. S.; H. Kaya; P. Stock and N. Keskün. 2004. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil Pests. *Journal of Biology*, 27: 181-202.

Hominick, W. 2002. Biogeography. (cap. 1 pp. 115-143) In: Gaugler, R. (ed.). Entomopathogenic nematology. Wallingford, UK: CABI. 400p.

Jaworska, M.; D.Ropek, and P. Tomasik. 1999. Chemical stimulation of productivity and pathogenicity of entomopathogenic nematodes. *Journal Invertebrate Pathology*, 73: 228–230.

Kaya, H. 1990. Soil ecology. (cap. 3, pp. 93–116). In: Gaugler, R., and H. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control. Philadelphia, EE.UU. 365p.

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

Kaya, H. and P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. (cap. 4, pp. 281-314). In: Lacey L., (ed.). Manual of techniques in insect pathology. San Diego, EE.UU. 395p.

Karban, R.; A. Hodson; D. Gruner; E. Lewis; J. Karban; M. Joseph; T. Mata, and D. Strong. 2011. Lack of susceptibility of soil-inhabiting *Platyrepia virginialis* caterpillars, a native arctiid, to entomopathogenic nematodes in nature. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140: 28–34.

Koppenhöfer, M.; H. Kaya and S. Taormino. 1996. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal. Invertebrate Pathology*, 65: 193-199.

Koppenhöfer, M. 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.

Leite, G.; M. Tavares; A. Bussóla; S. Amorim; R. Ambró and R. Harakava. 2007. Virulence of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) against larva of the fungus gnat *Bradysia mabiusi* and persistence of *Heterorhabditis indica* on organic substrates. *Arquivos do Instituto Biológico*, 337-342.

- Lewis, E; R. Gaugler, and R. Harrison. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology*, 71:765–69.
- Lewis, A.; J. Campbell; C. Griffind; H. Kaya and A. Peters. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38: 66-79.
- Lezama-Gutierrez, 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: 41–49.
- Loya, J. and J. Hower. 2002. Population dynamics, persistence, and efficacy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Oswego strain) in association with the clover root curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Pennsylvania. *Environmental Entomology*, 31:1240–1250.
- Mac Millan, K.; S. Haukeland; R. Rae; I. Young; J. Crawford; S. Hapca and M. Wilson. 2009. Dispersal patterns and behaviour of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in mineral soils and organic media. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1483–1490
- Miduturi, J.; L. Waeyenberge and M. Moens. 1997. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Belgian soils. *Journal Nematology*, 5: 55-65.
- Miles, C.; C. Blethen; R. Gaugler; D. Shapiro-Ilan and T. Murray. 2012. Using entomopathogenic nematodes for crop insect pest control. Washington State University. Wahington, EE. UU. 11p.
- Moyle, L. and H. Kaya. 1981. Dispersal infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) in sand. *Journal of Nematology*, 13: 295-300.
- Mwaniki, W.; J. Nderitu; F. Olubayo and J. Kimenju. Effects of soil texture on virulence and survival of *Steinernema karii* and *Heterorhabditis indica*. *Kenya Agricultural Research*, 754-758.
- Poinar, G. and A. Hom. 1986. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field. *Journal of Nematology*, 18: 34-36.
- Portillo-Aguilar, C.; G. Villani; J. Tauber; A. Tauber and P. Nyrop. 1999. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environmental Entomology*, 15: 1021-1035.
- Rojas, C. 2014. Biofiltros angostos como medida de mitigación para reducir las pérdidas de nitrógeno desde campos de maíz en la zona central de Chile: balance de nitrógeno durante

el primer año. Tesis de Magíster en Ciencias Agropecuarias, mención Suelos y Agua. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 90p.

Sáenz A. y W. Olivares. 2008. Capacidad de búsqueda del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhabditida: Steinernematidae). Revista Colombiana de Entomología, 34: 51-56.

Shapiro- Ilan, D.; C. Mccoy; A. Fares; T. Obreza and H. Dou. 2000. Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). Journal Biological Control, 29: 1083-1087.

Shapiro-Ilan, D.; T. Leskey and S. Wright. 2011. Virulence of entomopathogenic nematodes to plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*: Effects of strain, temperature, and soil type. Journal Nematology, 43: 187–195.

Sharma, M.; Sharma, A. and S. Hussaini. 2011. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialization status a mini review. Phytopathology and Plant Protection, 44: 855-870.

Stock, P.; B. Pryor and H. Kaya. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodiversity and Conservation, 8: 535-549.

Susurluk, I. 2008. Influence of temperature on the vertical movement of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (TUR-S3) and *Heterorhabditis bacteriophora* (TUR-H2), and infectivity. Journal Nematology, 10: 137-14.

Toepfer, S.; K. Benedikt and U. Kuhlmann. 2010. Influence of soil on the efficacy of entomopathogenic nematodes in reducing *Diabrotica virgifera virgifera* in maize. Journal of Pest Science, 83: 257–264.

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

Yan, X.; R. Han; M. Moens; S. Chen and P. De Clercq. 2012. Field evaluation of entomopathogenic nematodes for biological control of striped flea beetle, *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Biocontrol, 58: 247-256.

Zamorano, E. 2009. Uso de *Bacillus thuringiensis* como agente de control de larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Memoria Ingeniero Agrónomo. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 55 p.

## APÉNDICE I

### Análisis estadísticos de Experimento 1 y 2.

#### 1. Concentraciones de *Steinernema* sp. en distintas texturas de suelo

S = 0,2654 R-cuad. = 83,84% R-cuad.(ajustado) = 80,14%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Concentración	3	14,4679	4,82262	68,45	0,000
Textura	2	1,0445	0,52223	7,41	0,002
Interacción	6	2,0330	0,33884	4,81	0,001
Error	48	3,3817	0,07045		
Total	59	20,9271			

#### Concentración de *Steinernema* sp. en suelo de textura franca

S = 0,2465 R-cuad. = 82,86% R-cuad. (ajustado) = 79,64%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Concentración	3	4,6981	1,5660	25,78	0,000
Error	16	0,9721	0,0608		
Total	19	5,6701			

#### Concentración de *Steinernema* sp. en suelo de textura arenosa

S = 0,1639 R-cuad. = 94,14% R-cuad.(ajustado) = 93,04%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Concentración	3	6,9079	2,3026	85,69	0,000
Error	16	0,4299	0,0269		
Total	19	7,3379			

#### Concentración de *Steinernema* sp. en suelo de textura arcillosa

S = 0,3518 R-cuad. = 71,20% R-cuad. (ajustado) = 65,80%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Concentración	3	4,895	1,632	13,19	0,000
Error	16	1,980	0,124		
Total	19	6,875			

## 2. Desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp. en distintas texturas de suelo

S = 0,3228 R-cuad. = 77,67% R-cuad. (ajustado) = 72,56%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. horizontal	2	1,7418	0,87089	8,36	0,001
Suelo	3	13,8861	4,62869	44,43	0,000
Interacción	6	1,7701	0,29502	2,83	0,019
Error	48	5,0007	0,10418		
Total	59	22,3987			

### Desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp. en suelo de textura franca

S = 0,2125 R-cuad. = 86,09% R-cuad. (ajustado) = 83,48%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. horizontal	3	4,4717	1,4906	33,01	0,000
Error	16	0,7224	0,0452		
Total	19	5,1941			

### Desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp. en suelo de textura arenosa

S = 0,3358 R-cuad. = 82,90% R-cuad.(ajustado) = 79,69%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. horizontal	3	8,748	2,916	25,86	0,000
Error	16	1,805	0,113		
Total	19	10,553			

### Desplazamiento horizontal de *Steinernema* sp. en suelo de textura arcillosa

S = 0,3932 R-cuad. = 49,62% R-cuad.(ajustado) = 40,17%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. horizontal	3	2,436	0,812	5,25	0,010
Error	16	2,474	0,155		
Total	19	4,910			

### 3. Desplazamiento vertical de *Steinernema* sp. en distintas texturas de suelo

S = 0,2894 R-cuad. = 86,78% R-cuad.(ajustado) = 83,84%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Textura	2	3,9053	1,95267	23,31	0,000
D. vertical	2	13,2764	6,63822	79,25	0,000
Interacción	4	2,6053	0,65132	7,78	0,000
Error	36	3,0153	0,08376		
Total	44	22,8023			

#### Desplazamiento vertical de *Steinernema* sp. en suelo de textura Franca

S = 0,3816 R-cuad. = 78,15% R-cuad.(ajustado) = 74,51%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. vertical	2	6,251	3,125	21,46	0,000
Error	12	1,747	0,146		
Total	14	7,998			

#### Desplazamiento vertical de *Steinernema* sp. en suelo de textura arenosa

S = 0,2135 R-cuad. = 92,42% R-cuad. (ajustado) = 91,16%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. vertical	2	6,6701	3,3350	73,16	0,000
Error	12	0,5470	0,0456		
Total	14	7,2171			

#### Desplazamiento vertical de *Steinernema* sp. en suelo de textura arcillosa

S = 0,2451 R-cuad. = 80,42% R-cuad.(ajustado) = 77,16%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
D. vertical	2	2,9609	1,4804	24,65	0,000
Error	12	0,7208	0,0601		
Total	14	3,6817			

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Páginas</b>
CAPÍTULO I: EFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE EL DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS .	1
Nemátodos entomopatógenos (NEP) .....	1
Ciclo de vida.....	2
Ventajas y desventajas del uso de NEP.....	2
Factores que influyen en su establecimiento y acción.....	4
Uso de NEP en Chile.....	5
LITERATURA CITADA .....	7
CAPÍTULO II: EFECTO DE LA TEXTURA DEL SUELO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESPLAZAMIENTO E INFECTIVIDAD EN LABORATORIO DE <i>Steinernema</i> sp. AISLAMIENTO LICÁN RAY .....	12
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
HIPÓTESIS .....	16
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
Lugar de estudio.....	17
Nemátodos entomopatógenos .....	17
Crianza de <i>G. mellonella</i> (L.) (Polilla de la cera).....	17
Suelos.....	17
Arena experimental.....	19
Experimento 1. Determinación de concentración de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray.....	20
Experimento 2. Capacidad de desplazamiento horizontal y vertical de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray en el suelo .....	22
RESULTADOS .....	24

Efecto de la concentración de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray sobre la mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> (L.), en suelos de textura diferente.....	24
Desplazamiento horizontal de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura.....	27
Velocidad de infección de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray a diferentes distancias horizontales y texturas de suelo .....	28
Desplazamiento vertical de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray en suelos de diferentes texturas .....	30
Velocidad de infección de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray a diferentes profundidades y texturas de suelo.....	31
DISCUSIÓN.....	33
Concentraciones de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura .....	33
Desplazamiento de <i>Steinernema</i> sp. aislamiento Licán Ray en suelos de distinta textura .....	35
CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA .....	41
APÉNDICE I.....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Páginas</b>
1. Guía recomendada de proveedores de NEP.....	3
2. Propiedades físicas de suelos: arcilloso, franco y arenoso.....	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
1. Ciclo de vida de NEP del género <i>Steinernema</i> .....	3
2. Recipientes utilizados para eliminar la carga microbiológica de los suelos.....	18
3. Arena experimental: Tubo de PVC.....	19
4. Placas Petri plásticas con malla de acero inoxidable en ambas caras, con suelo y cinco larvas de <i>G. mellonella</i> (L.) de último estadio; placa dentro del tubo de PVC con suelo del mismo tipo.....	19
5. Aplicación de NEP con una pipeta (a). Arena experimental para establecer concentración de <i>Steinernema</i> sp. sobre <i>G. mellonella</i> en suelos de distinta texturas (b).....	20
6. Síntomas de infección causados por bacterias del género <i>Steinernema</i> , coloración marrón en larvas de <i>G. mellonella</i> (L.).....	21
7. Traslado de larvas de <i>G. mellonella</i> muertas de placa Petri con malla a trampa White y caída de JI de <i>Steinernemasp.</i> al agua después de 10 días .....	21
8. Desplazamiento horizontal.....	22
9. Desplazamiento vertical.....	23
10. Mortalidad acumulada (%) de <i>G. mellonella</i> después de 9 días de aplicación de distintas concentraciones, 4.400, 2.200, 440 y 0 NEP/ tubo a suelos de distinta textura, arcilloso, arenoso y franco .....	24
11. Mortalidad (%) de <i>G. mellonella</i> a los 3, 6 y 9 días después de aplicadas las distintas concentraciones de NEP: 0; 440; 2.200; y 4.400 (NEP/ tubo) en tres tipos de suelo.....	26
12. Mortalidad acumulada (%) de <i>G. mellonella</i> ubicadas horizontalmente a 10, 20, 30 y 40 cm del punto de aplicación de <i>Steinernemasp.</i> en suelos de textura, arcillosa, arenosa y franca.....	27
13. Mortalidad (%) de <i>G. mellonella</i> después de 3, 6 y 9 días de aplicados NEP en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F) a diferentes distancias de latrampa con <i>G. mellonella</i> , 10, 20, 30 y 40 cm, de forma horizontal.....	29

- 14.** Mortalidad acumulada (%) de *G. mellonella* ubicadas verticalmente a 30, 50 y 70 cm de *Steinernemasp.* en suelos de textura, arcillosa, arenosa y franca.....30
- 15.** Mortalidad (%) de *G. mellonella* después de 3, 6 y 9 días de aplicados NEP en suelos de textura, arcillosa (A), arenosa (a) y franca (F) a distintas distancias de *G. mellonella*, 30, 50 y 70 cm de forma vertical.....31