

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

MEMORIA DE TÍTULO

CAPACIDAD DE DIFERENTES ESPECIES HORTÍCOLAS DE ATRAER  
NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* AL SER  
ATACADAS POR EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA (*Agrotis bilitura* Guenée)

MARÍA DE LOS ÁNGELES QUEZADA CEPEDA

Santiago, Chile

2018

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

MEMORIA DE TÍTULO

CAPACIDAD DE DIFERENTES ESPECIES HORTÍCOLAS DE ATRAER  
NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* AL SER  
ATACADAS POR EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA (*Agrotis bilitura* Guenée)

CAPACITY OF DIFFERENT HORTICULTURAL SPECIES OF ATTRACTING  
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES OF THE GENDER *Steinernema* WHEN  
ATTACKED BY THE POTATO CUT WORM (*Agrotis bilitura* Guenée)

MARÍA DE LOS ÁNGELES QUEZADA CEPEDA

Santiago, Chile

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**CAPACIDAD DE DIFERENTES ESPECIES HORTÍCOLAS DE ATRAER  
NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *Steinernema* AL SER  
ATACADAS POR EL GUSANO CORTADOR DE LA PAPA (*Agrotis bilitura* Guenée)**

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniero Agrónomo

**MARÍA DE LOS ÁNGELES QUEZADA CEPEDA**

<b>Profesores Guía</b>	<b>Calificaciones</b>
Srta. Gabriela Lankin Vega Ingeniero Agrónomo Ph. D.	6,5
Erwin Aballay Espinoza Ingeniero Agrónomo Ph. D.	6,8
<b>Profesores Evaluadores</b>	
Tomislav Curkovic Sekul Ingeniero Agrónomo Ph. D.	5,8
Antonio Lizana Malinconi Ingeniero Agrónomo Ph. D.	6,6

Santiago, Chile

2018

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis profesores guía, Gabriela Lankin y Erwin Aballay, por el entusiasmo, la amabilidad y por haberme aceptado como memorante desertora de otro departamento. No puedo dejar de mencionar al profesor Ian Homer, quien me ayudó en la construcción de los olfactómetros, me enseñó a usar sus máquinas y me permitió amablemente trabajar en su taller.

Agradecer a Carlos Castañeda, “el colombiano” del laboratorio de Nematología, quien me ayudó siempre que acudí a él con mucha paciencia, buena disposición y claridad para enseñar.

A mi tía Margot y a mi prima Karina, quienes sin saber nada del tema abordado en esta memoria, quisieron leer el borrador e hicieron sus comentarios para ayudarme a obtener una buena nota.

Mención honrosa a Valentina Armijo, compañera y amiga, quien me aconsejó cambiarme de tema de memoria y aquí estoy. Qué bueno que la escuché. Y a Catalina Cuevas, quien fue mi partner durante la vida universitaria y la memoria, criando nuestras polillas y nematodos.

Por último, pero no menos importante, y aunque no participaron de forma directa en la realización de esta memoria, agradecer a los pilares de la vida: Mis papás Nelson y Marcia, por el amor, apoyo y por enseñarme el camino a seguir. Voy por buen camino. Nuevamente, a mi tía Margot por apoyarme de distintas formas cuando supo que quedé en la universidad. A mis amigos de la vida, quienes no se aburrían (creo) de escucharme hablar sobre mi crianza de polillas y nemátodos. A mi Yeya, que aunque ya no esté de forma tangible en este mundo, el amor que me tenía siempre está presente en mi corazón y sé que le habría encantado verme defendiendo el título. A mi abuelita Corina, por ser mi “aweli” y enseñarme que aunque se tengan 90 y tantos años, la sonrisa y la energía no se deben perder nunca. A mis hermanos, que de alguna manera participaron de mi proceso universitario, ya sea, acompañándome al cerro Chena a buscar plantas para el herbario o carreando conmigo en Antumapu. Y finalmente, a mi Rodrigo, por siempre felicitarme por mis logros y darme el impulso, aunque a veces fueran retos, para terminar esto de una vez por todas.

Mención especial para Cocco, quien me acompañó a rendir una prueba el día que lo adopté y se portó un 7 y que en más de alguna ocasión lamió mis lágrimas cuando lloré por culpa de alguna mala nota. Y para Choapi, por haber llegado a mi vida a mostrarme y contagiarme esa felicidad única que transmiten los seres como él.

## RESUMEN

Varios estudios señalan que las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa llamado “respuesta guardaespaldas”, la cual se activa cuando son atacadas por algún insecto herbívoro, liberando compuestos volátiles y atrayendo a enemigos naturales, entre los que destacan los nematodos entomopatógenos (NEP), como defensa indirecta al ataque. Se ha demostrado que la respuesta guardaespaldas actúa de forma específica en el sistema planta-plaga-enemigo natural. Este estudio comparó el nivel de atracción de 6 especies vegetales, cuando son atacadas por el gusano cortador de la papa *Agrotis bilitura* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae), hacia el NEP *Steinernema sp.* aislamiento Licán Ray en condiciones de laboratorio. Para ello, las 6 especies vegetales fueron comparadas en grupos de a 3: Betarraga, repollo y trébol rosado en el grupo 1 y lechuga, acelga y tomate en el grupo 2. Para esto, se utilizó un olfactómetro de PVC de seis brazos para cada grupo, estructura compuesta por una maceta central a la cual están conectados de manera equidistante, 6 brazos de igual longitud. Además, cada brazo está conectado a una maceta más pequeña en su extremo distal por medio de un tubo conector que posee una malla de 75  $\mu\text{m}$  para coleccionar los nemátodos. Esta estructura se encontraba llena de suelo franco a capacidad de campo, tratado con calor húmedo para eliminar la presencia de otros organismos. Se trasplantaron 4 plantas con 4-6 hojas de cada especie a comparar, en las macetas distales de forma alternada en el olfactómetro, dejando una maceta sin plantas entre cada tratamiento como control. Se colocaron dos larvas de *A. bilitura* en estadio L6 en cada maceta, para que se alimentara libremente de las plantas. Al cabo de tres días, se aplicó 3mL con 2000 J3 del NEP aprox. en la maceta central. 48 horas después, el suelo contenido en el tubo conector con la malla de 75  $\mu\text{m}$  se procesó con el método de tamizado, contabilizando los nematodos colectados en una lupa a 50X. Los resultados arrojaron que, en términos relativos, el repollo fue el más atractivo para los NEP y la lechuga, la menos atractiva. En un segundo experimento, se colectó el agua de riego que se utilizó para plantas de repollo atacadas por *A. bilitura*, y al igual que en la descripción anterior, se utilizó un olfactómetro para comparar la atracción de repollos atacados por *A. bilitura*, lechugas atacadas por *A. bilitura* y lechuga regada con el agua colectada desde macetas con repollo. En este caso, no hubo diferencias significativas entre el repollo y la lechuga atacadas por el herbívoro. La lechuga regada con exudados de repollo mostró un menor nivel de atracción hacia el NEP. Del experimento 1, se infiere que el repollo, cuando es atacado por *A. bilitura*, libera compuestos volátiles que son más atractivos para el NEP frente a las otras especies vegetales estudiadas. Con respecto al experimento 2, se deduce que podría utilizarse un método más preciso para coleccionar exudados y que disminuya la probabilidad de difusión de activos para evaluar este efecto.

**Palabras clave:** Respuesta guardaespaldas, exudados, control biológico, olfactómetro

## ABSTRACT

Several studies show that plants have developed a defense mechanism called "bodyguard response", which is activated when they are attacked by some herbivore insect, releasing volatile compounds to attract natural enemies, such as entomopathogenic nematodes (EPN), as an indirect defense to the attack. The bodyguard response has been shown to act in a specific way in a system plant-pest-natural enemy. This study compared the attractiveness of 6 plant species, when attacked by the potato worm *Agrotis bilitura* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae), towards the EPN *Steinernema* sp. isolation Licán Ray under laboratory conditions. The 6 plant species were compared in groups of 3: Beetroot, cabbage and pink clover in group 1 and lettuce, silverbeet and tomato in group 2. One 6-arms PVC olfactometer was used per group, structure composed by a central pot with 6 equidistant arms of equal length. Each arm is connected to a smaller pot at its distal end through a connector tube that has a 75 µm mesh to collect the nematodes. The olfactometer was filled with field capacity loam soil, treated with moist heat to eliminate any other organisms. Four plants with 4-6 leaves of each species were transplanted in the distal pots alternately in the olfactometer to be compared, leaving a pot without plants between each treatment as a control. Two larvae of *A. bilitura* in instar L6 were placed in each pot, to feed freely on plants. After 3 days, 3 mL with 2000 J3 of NEP approximately was applied in the central pot. Forty-eight hours later, the soil contained in the connector tube of each arm with the 75 µm mesh was processed with the sieve method, counting the collected nematodes using a 50X magnifying glass. The results showed that, in relative terms, cabbage was the most attractive for EPN, and lettuce the least. In a second experiment, the used to irrigate cabbage plants attacked by *A. bilitura* was collected and, in the same way as in the previous experiment described, an olfactometer was used to compare the attraction of cabbage attacked by *A. bilitura*, lettuce attacked by *A. bilitura* and lettuce irrigated with the water collected from cabbage pots. In this case, there was no significant difference between the cabbage and the lettuce attacked by the herbivore. Lettuce watered with cabbage exudates showed a lower level of attraction to EPN than the other treatments. From the experiment 1, it is inferred that when cabbage is attacked by *A. bilitura*, it releases volatile compounds that are more attractive to the EPN than the other plant species studied. In relation to the experiment 2, the results suggest that a more accurate method for collecting volatiles should be used to reduce the probability of spreading compounds to evaluate the outcome.

**Keywords:** Bodyguard response, volatiles, biological control, olfactometer

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis .....	3
Objetivo .....	3
MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
Lugar de estudio.....	4
Suelo .....	4
Cultivos.....	4
Crianza de <i>Agrotis bilitura</i> .....	5
Crianza de <i>Galleria mellonella</i> .....	6
Multiplicación de Nemátodos Entomopatógenos .....	6
Olfatómetro .....	7
Extracción exudados vegetales .....	9
Experimentos .....	9
Experimento 1 .....	9
Experimento 2.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
Experimento 1 .....	14
Experimento 2.....	16
Discusión .....	16
CONCLUSIONES .....	18
BIBLIOGRAFÍA .....	19

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado numerosos mecanismos de defensa, inducidos por señales específicas, las que actúan en contra de agentes bióticos y abióticos que representen una amenaza (Arimura et al., 2000). Dentro de estos mecanismos, se ha observado la capacidad de algunas plantas de reclutar a otros organismos, que actúan como enemigos naturales de algún atacante herbívoro, más específicamente, un insecto (Turlings y Wäckers, 2004). Este mecanismo, que implica la interacción planta–herbívoro–enemigo natural, forma parte de las interacciones tritróficas y es comúnmente conocido como la “respuesta guardaespaldas” (Anastasaki et al., 2015).

La “respuesta guardaespaldas” está mediada por la liberación, por parte de la planta, de sustancias químicas pertenecientes al grupo de los terpenos o indoles (Turlings et al., 1991) cuando la planta percibe el ataque del insecto herbívoro al entrar en contacto con las secreciones orales o la saliva de éste (Alborn et al., 2000; De Moraes et al., 2001). Estos compuestos volátiles pueden ser liberados en la parte aérea de la planta para atraer depredadores o parasitoides de la especie atacante (Anastasaki et al., 2015), o por estructuras subterráneas, para atraer nemátodos entomopatógenos (NEP) (Hiltpold et al., 2010), entre otros.

Turlings et al. (1991) observó que, plantas de maíz, al ser atacadas por larvas de *Spodoptera exigua* Hübner, Lepidóptera, perteneciente a la familia Noctuidae, emitían compuestos químicos como una respuesta inmune a la saliva de este insecto, atrayendo eficazmente a hembras del himenóptero de la familia Braconidae, *Cotesia marginiventris* Cresson, (enemigo natural y parasitoide de este herbívoro). Posteriormente, Alborn et al. (2000) identificó este compuesto como un químico que se encuentra en la saliva de *S. exigua* llamado Volicitin. Así mismo, Rasmann et al. (2005) observó que plantas de maíz atacadas por larvas del coleóptero de la familia Chrysomelidae, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte fueron más atractivas para el NEP *Heterorhabditis megidis* que plantas con daño mecánico o planta sin heridas. Estos autores aislaron el compuesto volátil Beta-cariofileno, responsable de la atracción desde plantas dañadas por las larvas, el que no estaba presente en plantas sin daño o dañadas mecánicamente con una herramienta metálica.

Interacciones de este tipo cobran mucha importancia al considerar que un gran porcentaje de los insectos herbívoros, incluidas las especies plaga, desarrollan gran parte de su vida bajo la superficie del suelo, pudiendo afectar a la parte subterránea de las plantas (Johnson y Rasmann, 2015). Bajo estas condiciones, es posible utilizar estas interacciones en beneficio de la sanidad de los cultivos (Turlings y Hiltpold, 2012).

Un estudio realizado con *Aeneolamia varia* Fabricius, importante plaga del suelo en los cultivos de caña de azúcar y algunos pastos, demostró que diferentes especies de NEP, entre las cuales se encontraba *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp1, *Steinernema* sp2, *Steinernema colombiense*,

*Steinernema* O1R1 y *Heterorhabditis bacteriophora*, tenían distinto nivel de control sobre esta especie plaga, registrando porcentajes de mortalidad muy diferentes en cada especie (Rosero, 2011) lo que demuestra que las especies plaga pueden ser más o menos sensibles a los diferentes aislamientos de NEP.

En Chile, los cultivos de hortalizas ocupan aproximadamente 70 mil hectáreas y están dedicados casi en su totalidad al consumo local (INE, 2014). Dentro de las plagas agrícolas de importancia que viven en el suelo y que atacan a este grupo de cultivos se destacan algunas especies pertenecientes a la familia Noctuidae (González, 1989), como el gusano cortador de la papa, *Agrotis bilitura* Gueneé. Esta polífaga especie puede afectar numerosos cultivos, como lechuga, tomate, papa, acelga, espárrago, betarraga, repollo y espinaca, entre muchos otros, y también especies forrajeras como alfalfa y algunas especies de trébol (Navarro et al., 2009). La presencia de esta plaga es especialmente importante en el establecimiento de los cultivos, con pérdidas importantes en los rendimientos en ataques severos (Johnson y Rasmann, 2015).

Dentro de los organismos que habitan en el suelo, se destacan los NEP, los cuales se han estudiado con éxito como controladores biológicos de plagas en este hábitat, especialmente los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Dillman et al., 2012). En el ciclo de vida de estos organismos, el tercer estado juvenil (J3) o juvenil infectivo (JI) tiene la capacidad de buscar activamente al insecto hospedero siguiendo señales químicas en el suelo y penetrar al hemocele de éste, donde liberan bacterias simbiotas que portan en el canal alimentario. *Steinernema* y *Heterorhabditis* se asocian a bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Estas bacterias se multiplican y matan al insecto por septicemia en 24-48 horas. Los NEP se alimentan del caldo de bacterias y tejidos degradados del insecto hospedero, donde se reproducen y producen varias generaciones dentro del cadáver (Burnell y Stock, 2000). Cuando se acaba el alimento y el espacio, nuevos J3 abandonan el cadáver en busca de nuevos insectos hospederos (Kaya y Gaugler, 1993). Algunas especies de NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* han sido producidas comercialmente y usadas como agentes de control biológico de muchas plagas del suelo (Grewal et al., 2005), pero no se encuentran comercialmente en Chile. Algunos estudios han demostrado que los NEP pueden responder a señales químicas emitidas por las plantas al ser atacadas por insectos plaga (Rasmann, 2005; Ali et al., 2010; Turlings y Hiltbold, 2012)

Al respecto, Turlings y Hiltbold (2012) plantean que comprender la emisión de exudados por parte de las plantas, y su rol en las interacciones ecológicas, abre nuevas rutas en la protección de cultivos, al aprovechar la capacidad de éstas de defenderse naturalmente. Por ejemplo, Rasmann et al. (2005) determinó que no todas las especies o variedades de plantas son capaces de emitir los exudados que generan la respuesta guardaespaldas en NEP. Los autores observaron que líneas de maíz provenientes de programas de mejoramiento genético habían perdido la capacidad de emitir estas señales que atraen a los NEP, mientras que líneas de maíz más rústicas emitían los volátiles que causaban esta respuesta.

En base a lo anterior, este trabajo buscó evaluar la capacidad de distintas especies hortícolas y forrajeras de atraer al NEP nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray al ser atacadas por el gusano cortador de la papa *A. bilitura*.

Este NEP fue aislado desde el suelo de un bosque en Licán Ray por el Laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, y se ha mantenido en crianza desde el año 2010. Varios estudios realizados por este equipo con este NEP han demostrado su capacidad de infectar a *A. bilitura* (Burgos, 2016) y además sugieren un gran potencial como controlador biológico, por su gran capacidad de desplazamiento en suelos de diferentes texturas (Vidal, 2014) y diferente contenido de materia orgánica (Allende, 2015).

Las especies vegetales que se evaluaron son hospederos comunes de esta plaga: repollo, (*Brassica oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla), betarraga (*Beta vulgaris* L. var. conditiva), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Todas las variedades seleccionadas son de polinización abierta, considerando los antecedentes de la pérdida de capacidad de emitir ciertos exudados que determinó Rasmann et al. (2005) mencionados anteriormente.

### **Hipótesis**

El NEP nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray es atraído por exudados que algunas especies de hortalizas, entre lechuga, acelga, betarraga, repollo, tomate y trébol rosado, emiten al ser atacadas por el gusano cortador *Agrotis bilitura*.

### **Objetivos**

Objetivo general:

Determinar el nivel de atracción que ejercen 6 especies vegetales sobre el NEP nativo *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, al ser atacadas por larvas de *Agrotis bilitura*.

Objetivos específicos:

1. Comparar la atracción relativa de 6 especies vegetales al ser atacadas por el gusano cortador *A. bilitura* sobre *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray.
2. Seleccionar la especie más atractiva y la menos atractiva para *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray al ser atacada por *A. bilitura*.
3. Verificar la capacidad de atracción de un exudado vegetal extraído de una planta atractiva para *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray al ser aplicado en una planta menos atractiva para este NEP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

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

### Suelo

Para el establecimiento de las plantas y para el montaje del olfactómetro, se usó un suelo de textura franca, el cual se obtuvo de los primeros 40 cm del perfil (densidad 1,7 g/cm<sup>3</sup>), perteneciente a la Serie Santiago (CIREN, 1996), del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, comuna de La Pintana, Santiago (Cuadro 1). Para descartar la presencia de otros organismos que pudieran afectar el resultado de los experimentos, el suelo fue tratado mediante calor húmedo a una temperatura de 90°C durante 3 horas.

Para homogeneizar la humedad del suelo tratado, este se puso en baldes de 10 litros, perforados en su base, y posteriormente regados con agua destilada. Luego se dejaron drenar durante 24 a 48 horas hasta alcanzar capacidad de campo.

**Cuadro 1.** Propiedades físicas del suelo utilizado: Capacidad de retención de agua (porcentaje volumétrico de agua en el suelo), capacidad de campo (CC%), punto de marchitez permanente (PMP%) y humedad aprovechable (HA%). Distribución de partículas por tamaño (textura), arcilla (A), limo (L), y arena (a)

Clase textural	Capacidad de retención de agua Volumétrico (%)			Composición textural (%)		
	CC	PMP	HA	a	A	L
Franco	22	14	8	38	22.3	39.7

Fuente: CIREN RM (1996).

### Cultivos

Se utilizaron plantas de 4-6 hojas de 6 especies vegetales comúnmente consumidas por *A. bilitura*: repollo, (*Brassica oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla), betarraga (*Beta vulgaris* L. var. conditiva), tomate (*Solanum lycopersicum*) y trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). La siembra de las distintas especies se realizó en bandejas alveoladas sobre

un sustrato de turba, vermiculita y perlita (Pertuzé, 2015. Comunicación personal<sup>1</sup>) en proporción volumétrica de 1:1:1, previamente hidratada y tratada con temperatura alta por 10-15 minutos para eliminar otros microorganismos. Al alcanzar la tercera hoja, fueron trasplantadas a macetas plásticas con el suelo franco tratado, mencionado anteriormente (Figura 1).



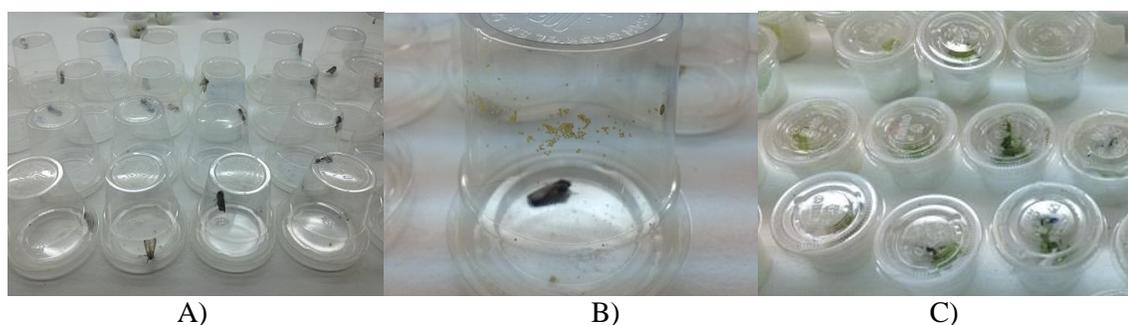
**Figura 1.** Bandeja alveolada con sustrato y plantas de lechuga emergiendo (izquierda). Macetas con 4 plantas de lechuga cada una (derecha).

### **Crianza de *Agrotis bilitura***

El material para la crianza se obtuvo de una colonia que se mantiene en el Laboratorio de Entomología de Cultivos, en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, a una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 horas de luz (Carrillo *et al.*, 2001). De esta colonia se obtuvieron adultos, los que se colocaron en recipientes plásticos, para permitir la oviposición de las hembras que estaban grávidas al momento de la captura. Los huevos fueron almacenados en los mismos recipientes de la oviposición bajo las mismas condiciones. Desde eclosión, las larvas fueron alimentadas con hojas de lechuga y acelga libres de plaguicidas. Luego de 7 días, fueron distribuidas en grupos de 25 individuos en recipientes de 200 mL con agujeros para la ventilación. Transcurridos otros 7 días, las larvas fueron puestas en forma individual en recipientes plásticos de 10 mL con agujeros para la ventilación (Figura 2).

---

<sup>1</sup> Pertuzé, 2015. Sustrato para almácigos. [Comunicación personal]. Laboratorio de Mejoramiento Hortícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.



**Figura 2.** A) Las hembras adultas de *A. bilitura* capturadas se colocan en recipientes, donde B) ponen huevos. C) Una vez que las larvas emergen de éstos, se ponen en recipientes individuales.

### **Crianza de *Galleria mellonella***

Para usar como hospedero de los NEP para su multiplicación, se mantuvo una crianza de la polilla de la cera *G. mellonella* en los laboratorios de Nematología y Entomología de Cultivos. Las colonias se mantuvieron en cajas plásticas con tapas adaptadas con una malla metálica para permitir la ventilación, y utilizando una dieta en base a cereales, glicerina, azúcar y un complejo polivitamínico, propuesta por Contreras (2011). Estas cajas se mantuvieron en cámaras de crianza a 25°C

### **Multiplicación de Nemátodos Entomopatógenos**

La crianza del NEP se realizó según el protocolo descrito por Kaya y Stock (1997), utilizando larvas de último estadio de *G. mellonella*. Para esto se inocularon 5 larvas con una suspensión de 1 mL de NEP con 500 J3, y luego de 48 h se colocaron en trampas White (Figura 3). Tras su emergencia desde el hospedero al cabo de 10 días, se colectaron los J3 y se almacenaron en agua destilada a una temperatura de 8°C hasta su uso, no más allá de un mes.



**Figura 3.** En una placa Petri se puso un disco de papel filtro en el cual se inocularon 500 J3 del NEP y luego se puso 5 larvas vivas de *G. mellonella* para que sean infestadas (izquierda). Luego de 48 hr las larvas que habían cambiado de coloración a un pardo oscuro fueron puestas en trampa White, correspondiente a una placa Petri con papel filtro dentro de una placa Petri más grande con agua destilada (derecha).

### Olfactómetro

Para determinar el efecto de los distintos exudados activos, se utilizó un olfactómetro de PVC de 6 brazos (Figura 4) adaptado de Rasmann *et al.* (2005). En este olfactómetro, seis brazos de 10 cm de largo están dispuestos en forma radial y equidistante, en una maceta central de aproximadamente 12 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. Cada brazo se conecta en su extremo distal a una maceta más pequeña, por medio de un tubo que posee en uno de sus extremos una malla de 75  $\mu\text{m}$  que actúa como barrera para el avance de los nematodos hacia la maceta lateral, y por lo tanto permite colectarlos y contarlos. Esta estructura se llenó completamente con el suelo descrito anteriormente.



**Figura 4.** (A) El tubo conector/colector de cada maceta lateral, que cuenta con una malla de 75  $\mu\text{m}$  en uno de sus extremos, (B) se llena con suelo y se acopla a maceta central. (C) La maceta central y las macetas laterales control se cubren con termoplástico flexible para evitar la desecación y cerrar el sistema, y las plantas se cubren con acrílico transparente agujereado para evitar el escape de las larvas. D) Plantas de acelga y larvas de *A. bilitura* en maceta lateral.

El experimento se realizó en una cámara a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

### Extracción exudados vegetales

Semillas de la especie vegetal seleccionada como la más atractiva, se esterilizaron en etanol al 95% por 5 minutos y se enjuagaron. Siguiendo la metodología utilizada por Aballay (2015. Comunicación personal<sup>2</sup>) se sembraron 20 de estas semillas en macetas plásticas esterilizadas, con sustrato de perlita esterilizada, en un incubador de plantas bajo condiciones controladas. Cuando las plantas constaban de 4-6 hojas, se pusieron 3 larvas L6 de *A. bilitura* en la maceta para que se alimenten libremente. Después de 2-3 días, o cuando el daño de los gusanos cortadores se observó en la mayoría de las plantas, las macetas fueron regadas con 200 mL de agua destilada y el agua fue colectada desde la bandeja que contenía a la maceta (Figura 5).



**Figura 5.** Maceta con sustrato de perlita y plantas de repollo, con larvas de *A. bilitura* de la cual se extrajo los exudados.

### Experimentos

**Experimento 1: Comparación de la capacidad de atracción de 6 especies vegetales sobre *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray al ser atacadas por el gusano cortador *A. bilitura*.**

**Unidad experimental y diseño experimental:** La unidad experimental consistió en macetas con plantas de 4-6 hojas en suelo franco tratado. El diseño experimental consistió en un bloque completamente aleatorizado, donde ambos olfactómetros (grupo 1 y grupo 2) representan un bloque. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

---

<sup>2</sup> Aballay, 2015. Método de extracción de exudados vegetales. [Comunicación personal]. Laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

**Montaje del olfactómetro:** Se comparó la atracción que ejercen 6 especies vegetales sobre *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, al ser atacadas por *A. bilitura*. Estas especies fueron comparadas en dos grupos de tres especies cada uno, donde los grupos fueron seleccionados al azar.

Grupo 1: Betarraga, repollo y trébol rosado.

Grupo 2: Lechuga, acelga y tomate.

En las macetas laterales de un olfactómetro lleno de suelo franco tratado, como se describe anteriormente, se trasplantaron cuatro plantas de 4-6 hojas, de acuerdo a los grupos formados al azar, dejando un brazo sin planta entre cada par de especies como tratamiento control (Figura 6).

**Tratamientos:** Para el desarrollo del experimento se utilizaron 2 olfactómetros, con 3 especies en cada uno de ellos. Cada especie vegetal equivale a un tratamiento.

El experimento comenzó cuando se colocaron dos larvas L6 de *A. bilitura* en cada maceta con plantas, para que se alimenten libremente de éstas. Previo a esto, y para homogeneizar su contenido gástrico, las larvas se dejaron en ayuno por 24 horas, individualmente en placas Petri con papel humedecido.

Después de 3 días, en la maceta central del olfactómetro se aplicó con una pipeta, 3 mL de una suspensión que contenía aproximadamente 2000 J3 del nemátodo.

**Evaluación:** Cuarenta y ocho horas después de la inoculación en la maceta central con NEP, los brazos del olfactómetro fueron removidos y el suelo en el tubo conector/colector de cada brazo se procesó de acuerdo al método de tamizado. Se utilizaron tamices de 20, 80 y 325 mallas/pulgada (833, 173 y 43 micrones de abertura, respectivamente) y se contabilizaron los nemátodos inmediatamente bajo lupa estereoscópica con un aumento de 50X.



**Figura 6.** A) Del olfactómetro se desacoplan los tubos conectores/colectores para B) tamizar el volumen de suelo en su interior, cada tubo por separado. C) El suelo que queda en el tamiz final se trasvasija a un vaso precipitado y se rellena con agua hasta completar los 200 mL. El contenido del vaso se revuelve y se extraen 10 mL que son puestos en una placa para conteo de nematodos D) y se observa a la lupa a 50X.

El número de NEP colectado desde los brazos control (sin plantas) de cada olfactómetro fuer promediado.

### Análisis estadístico

Las diferencias en las preferencias de los NEP por las especies incluidas en cada bloque fueron analizadas mediante el Modelo Lineal Generalizado de respuesta Poisson mediante el programa Infostat, dado que la variable a analizar es el número de nematodos. Cuando se encontró diferencias significativas se realizó una prueba de comparación múltiple de Fisher. Las comparaciones estadísticas se realizaron en cada grupo por separado, es decir, intra-olfactómetro. Nunca se analizó los resultados entre ambos olfactómetros.

Para seleccionar la especie más atractiva y la menos atractiva para los NEP al ser atacada por *A. bilitura*, las especies de hortalizas de ambos olfactómetros se ordenaron de forma creciente de acuerdo al número de NEP colectados.

#### **Experimento 2: Evaluación de la capacidad de atracción de un exudado vegetal de la planta más atractiva para *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, al ser aplicado en la planta menos atractiva para este NEP.**

**Unidad experimental y diseño experimental:** La unidad experimental consistió en macetas con plantas de 4-6 hojas en suelo franco tratado. El diseño experimental consistió en un bloque completamente aleatorizado, donde el olfactómetro completo representa un bloque. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

**Montaje del olfactómetro:** Para este experimento se obtuvo un exudado específico de la especie seleccionada en el experimento 1 como la más atractiva, repollo.

**Tratamientos:** El experimento consistió en tres tratamientos: (T1): plantas de la especie vegetal más atractiva seleccionada en el experimento anterior con 2 larvas L6 de *A. bilitura*; (T2) plantas de la especie vegetal menos atractiva, regada con 10 mL del exudado descrito; (T3) plantas de la especie menos atractiva con 2 larvas L6 a la que no se le agregó el exudado y se regó sólo con agua.

Un día después de regar las plantas con el exudado, la maceta central del olfactómetro fue inoculada por medio de una pipeta con 3 mL de una suspensión que contenía aproximadamente 2000 J3 de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray.

**Evaluación:** 48 h después de la inoculación de la maceta central con NEP, los brazos del olfactómetro fueron removidos y el suelo en cada brazo se procesó de acuerdo al método de tamizado. Se utilizaron tamices de 20, 80 y 325 mallas/pulgada y se contabilizaron los nemátodos inmediatamente bajo lupa estereoscópica con un aumento de 50X.

El número de NEP colectado desde los brazos control (sin plantas) fue promediado.

Para cada repetición en el experimento 1 y 2 se utilizaron larvas de *G. mellonella* como centinelas en placas Petri, siguiendo el método de inoculado mencionado anteriormente, y en cada repetición, éstas fueron efectivamente parasitadas por el NEP *Steinernema* sp.

### **Análisis estadístico**

Las diferencias en las preferencias de los NEP por las especies incluidas fueron analizadas mediante el Modelo Lineal Generalizado de respuesta Poisson, dado que la variable analizada fue el número de nematodos. Cuando se encontró diferencias significativas se realizó una prueba de comparación múltiple de Fisher. Se utilizó el programa Infostat.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimento 1. Comparación de la capacidad de atracción de dos grupos de 3 especies vegetales sobre *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray al ser atacadas por el gusano cortador *A. bilitura*:

El resultado de este ensayo consistió en el conteo total de los NEP *Steinernema* sp. vivos y muertos obtenidos a partir del volumen de suelo contenido en los tubos conectores/colectores de cada brazo lateral, a través del método del tamizado.

Se observó que en el grupo 1, compuesto por repollo, trébol rosado y betarraga, la especie más atractiva para los NEP *Steinernema* sp. fue el repollo, y la menos atractiva fue la betarraga.

Así mismo, en el grupo 2, conformado por lechuga, tomate y acelga, la planta más atractiva para los NEP fue el tomate y la menos atractiva, la lechuga (Cuadro 2).

Por lo tanto, considerando el número de NEP atraído por las 6 especies en estudio, es decir, de ambos olfactómetros, las especies se ordenan en forma decreciente en términos relativos, de la siguiente manera: Repollo, tomate, acelga, trébol rosado, betarraga y lechuga.

Se observó que la parte aérea de las plantas utilizadas en este ensayo, fue completamente consumida por las larvas de *A. bilitura* al tercer día desde el montaje. En algunos casos, como en trébol rosado y acelga, quedaban sólo los tallos, como se aprecia en la figura 7.



**Figura 7.** Maceta con plantas de repollo comidas por larvas de *A. bilitura* después de 2 días del montaje (izquierda). Olfactómetro con plantas dañadas casi en su totalidad por *A. bilitura* luego de 5 días del montaje (derecha).

**Cuadro 2.** Número de NEP (vivos y muertos) colectados desde brazos laterales del olfactómetro (media  $\pm$  desviación estándar) en los grupos 1 y 2.

	Tratamiento	Número de NEP
Grupo 1	Control	5,9 $\pm$ 5,2
	Repollo	22,6 $\pm$ 20,6
	T. rosado	4,5 $\pm$ 3,1
	Betarraga	2,6 $\pm$ 5,6
Grupo 2	Control	5,5 $\pm$ 7
	Lechuga	2,6 $\pm$ 4,6
	Tomate	16,8 $\pm$ 24,8
	Acelga	8,6 $\pm$ 17,7

De acuerdo a los resultados, hubo diferencias significativas entre tratamientos del grupo 1, aunque no se observaron estas diferencias entre el promedio de los tratamientos control y el trébol rosado, siendo el repollo la más atractiva para los NEP y la betarraga, la menos atractiva (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Medias ajustadas ( $\pm$  EE) según el MLG de respuesta Poisson del grupo 1, exp. 1.

Tratamiento	Media	E.E.	
Repollo	22,63	1,50	A*
Control	5,94	0,77	B
Trébol rosado	4,52	0,62	B
Betarraga	2,66	0,52	C

\*Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según prueba de Fisher.

Los resultados para el grupo 2 muestran diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tomate la especie más atractiva para los NEP y la lechuga la menos atractiva.

**Cuadro 4.** Medias ajustadas ( $\pm$  EE) según el MLG de respuesta Poisson del grupo 2, exp. 1.

Tratamiento	Media.	E.E	
Tomate	16,81	1,38	A*
Acelga	8,65	1,03	B
Prom controles	5,53	0,83	C
Lechuga	2,65	0,57	D

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según prueba de Fisher.

Según los resultados relativos obtenidos en el experimento 1, se escogió el repollo como la especie más atractiva y la lechuga como la menos atractiva para los NEP, por lo tanto, para realizar el experimento 2 se regó plantas de lechuga con exudados de repollo en uno de los tratamientos.

**Experimento 2. Evaluación de la capacidad de atracción de un exudado vegetal de la planta más atractiva para *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray, al ser aplicado en la planta menos atractiva para este NEP.**

El resultado de este ensayo consistió en el conteo total de los NEP vivos y muertos, del mismo modo que en el experimento 1.

Se comparó el nivel de atracción de plantas de repollo y plantas de lechugas atacadas por larvas de *A. bilitura* y plantas de lechuga sin ataque de larvas y regadas con exudados de repollo.

En este caso se observó que al agregar exudado de repollo en la maceta de lechuga sin larvas, hubo una menor atracción de NEP que en el tratamiento del repollo con larvas y lechugas con larva (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Número de NEP (vivos y muertos) colectados desde brazos laterales del olfactómetro (media  $\pm$  DE).

Tratamiento	Número de NEP
(T0) Control	7,3 $\pm$ 9,3
(T1) Repollo	15,9 $\pm$ 32,3
(T2) Lechuga c/ex	9,9 $\pm$ 10,5
(T3) Lechuga	16,6 $\pm$ 19,9

Según estos resultados, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el repollo (T1) y la lechuga (T3), así mismo, tampoco se encontraron estas diferencias entre el promedio de los tratamientos control (T0) y la lechuga regada con los exudados de repollo (T2), como lo muestra el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Medias ajustadas por el MLG de respuesta Poisson para experimento 2.

Tratamiento	PredLin	E.E.	Media	E.E	
(T3) Lechuga	2,81	0,08	16,64	1,29	A
(T1) Repollo	2,77	0,08	15,98	1,26	A
(T2) Lechuga c/ex	2,30	0,10	9,98	1,00	B
(T0) Prom control	1,99	0,12	7,31	0,85	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según prueba de Fisher.

## Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento 1, al comparar las 6 especies en estudio cuando son atacadas por larvas de *A. bilitura* las plantas de repollo fueron las más atractivas para el NEP *Steinernema* sp. Sin embargo, considerando que el estudio se llevó a cabo en 2 grupos, el tomate también figura como una especie atractiva para este NEP.

El distinto nivel de atracción de NEP que tuvo cada especie vegetal puede deberse a que no todas

activan la respuesta guardaespaldas frente al ataque de *A. bilitura* o que dicha respuesta no atrae específicamente a *Steinernema sp.* aislamiento Licán Ray.

En un estudio realizado por Weissteiner (2010), utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas, se identificó cinco compuestos orgánicos que eran liberados por las raíces de plantas de zanahoria atacadas por dos especies de gusanos. Posteriormente, Lasnik y Trdan (2015) estudiaron el comportamiento de 4 especies de NEP al ser expuestos a dichos compuestos observando que el comportamiento de cada especie de NEP fue distinto, incluso, algunos NEP fueron repelidos por algunos de estos compuestos. Entonces, en este estudio pudo haber ocurrido algo similar, al exponer los NEP a compuestos de distintas plantas y en distinta combinación.

Por otra parte, los resultados del experimento 2 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el repollo y la lechuga expuesta a larvas L6 de *A. bilitura*, resultado contrario al que se esperaría considerando los resultados en el experimento 1. Esto podría deberse a que ambas especies fueron analizadas en grupos diferentes, pero al estar juntas, mostraron el mismo nivel de atracción, estadísticamente hablando.

Si comparamos los promedios obtenidos por ambas especies en cada experimento (1 y 2), se observa que el repollo disminuyó su capacidad de atracción cuando fue enfrentada a la lechuga, y a su vez, la lechuga aumentó considerablemente su nivel de atracción en el experimento 2. Lo que conduce nuevamente, a interpretar estos resultados como que depende mucho la respuesta del NEP, de acuerdo a las especies vegetales contrastadas en cada olfactómetro.

Por otro lado, las plantas de lechuga que fueron regadas con exudados de repollo en el experimento 2 no mostraron diferencias significativas con los tratamientos control (sin plantas) y mostraron un menor nivel de atracción con respecto a los otros dos tratamientos.

En la actualidad existen métodos nuevos de extracción de exudados, como el desarrollado por Eilers et al. (2015) en el cual estos compuestos radicales son capturados en un recipiente de vidrio con distintos compartimentos, evitando la filtración o el escape de estos, representando un método más seguro pero a la vez más costoso a la hora de aplicar exudados radicales.

También se debe considerar que a través del tiempo y la evolución, cada especie va desarrollando mecanismos de defensas y en el caso de los insectos, algunos han desarrollado mecanismos para inhibir las sustancias tóxicas de las plantas e incluso utilizar estas sustancias para repeler a sus enemigos naturales (Vivanco et al, 2005).

Un estudio previo, realizado por Burgos (2016) en los laboratorios de Entomología de cultivos y Nematología de la Universidad de Chile, utilizando el mismo suelo de este estudio, demostró que *Steinernema sp.* aislamiento Licán Ray ejerce hasta un 66,7% de mortalidad de larvas de *A. bilitura* además de demostrar la capacidad de este nemátodo de movilizarse en el suelo y encontrar a su hospedero, por lo que el suelo no es considerado un factor que modifique los resultados.

Además en cada repetición, larvas centinelas fueron correctamente parasitadas por los NEP, indicando el buen estado de estos.

La interacción planta-hervívoro-NEP es muy compleja, por lo que hay mucha información que recabar y muchos estudios que realizar para poder avanzar en métodos concretos y efectivos de control biológico usando nemátodos entomopatógenos y exudados radicales.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

Las distintas especies hortícolas tienen distintos niveles de atracción hacia el NEP *Steinernema* sp. cuando son atacadas por *A. bilitura*.

De acuerdo al promedio de nematodos atraídos, considerando las 6 especies vegetales estudiadas en 2 grupos de 3 especies cada uno y analizados estadísticamente por separado, la planta que fue más atractiva para el NEP fue el repollo, perteneciente al grupo 1 y la menos atractiva fue la lechuga perteneciente al grupo 2.

Al comparar la lechuga y el repollo en un mismo olfactómetro, no presentan diferencias significativas en su capacidad de atraer NEP cuando son atacadas por *A. bilitura*.

La aplicación de la solución de repollo en plantas de lechuga mostró un nivel de atracción considerablemente menor que los tratamientos de lechuga y repollo atacados por *A. bilitura*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alborn, H., T. Jones, G. Stenhagen y J. Tumlinson. 2000. Identification and synthesis of volicitin and related components from beet armyworm oral secretions. *Journal of chemical ecology*. 26:203-220.
- Ali, J., H. Alborn y L. Stelinski. 2010. Subterranean herbivore-induced volátiles released by citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. *Journal of chemical ecology*, 36: 361-368.
- Allende, G. 2015. Efecto del contenido de materia orgánica en el suelo y su grado de descomposición sobre el desplazamiento de *Steinernema* sp. Aislamiento Licán Ray bajo condiciones de laboratorio. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 33 p.
- Anastasaki, E., G. Balayannis, N. Papanikolaou, A. Michaelakis y P. Milonas. 2015. Oviposition induced volatiles in tomato plants. *Phytochemistry letters*. 13: 262-266.
- Arimura, G., K. Tashiro, S. Kuhara, T. Nishioka, R. Ozawa y J. Takabayashi. 2000. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochemical and biophysical communications*, 227(2): 305-310.
- Burgos, E. 2016. Efecto del ataque de nematodos entomopatógenos nativos del género *Steinernema* sobre el gusano cortador de la papa (*Agrotis bilitura* Gueneé) en condiciones de laboratorio. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 30 p.
- Burnell, A. y S. Stock. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1): 31-42.
- Carrillo, R., C. Cornejo y M. Neira. 2001. Larvas de Noctuidos en praderas permanentes en Valdivia, Chile, durante el período invernal. *Agrosur*. 29: 27-31.
- CIREN. 1996. Estudio agrológico Región Metropolitana, descripciones de suelos materiales y símbolos. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN). 425 p.
- Contreras, L. 2011. Utilización de un extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) para el control de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidóptera: Pyralidae). Memoria Ingeniero Agrónomo. Valdivia, Chile: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 54 p.
- De Moraes, C., M. Mescher y J. Tumlinson. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plants volatiles repel conspecific females. *Nature*. 410: 557-580.

- Dillman, A., J. Chaston, B. Adams, T. Ciche, H. Googrich-Blair, S. Stock y P. Sternberg. 2012. An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. [en línea]. California, Estados Unidos. PLOS. Recuperado en: < <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002527>> Consultado el: 08/07/2015.
- Eilers, E., G. Pauls, M. Rillig, B. Hansson, M. Hilker y A. Reinecke. 2015. Novel set-up for low-disturbance sampling of volatile and non-volatile compounds from plant roots. *Journal of chemical ecology*. 41(3): 253-266.
- González, R. 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 310 p.
- Grewal, P., R. Ehlers y D. Shapiro. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI publishing. Wallingford.
- Hiltpold, I., M. Baroni, S. Toepfer, U. Kuhlmann y T. Turlings. 2010. Selection of entomopathogenic nematodes for enhanced responsiveness to a volatile root signal helps to control a major root pest. *The journal of experimental biology*. 213: 2417-2423.
- INE. 2014. Hortalizas Anuales 2014. [en línea]. Santiago, Chile. ODEPA. Recuperado en: <<http://www.odepa.cl/rubro/hortalizas-frescas/>>. Consultado el: 08/07/2015.
- Johnson, S. y S. Rasmann. 2015. Root-feeding insects and their interactions with organisms in the rhizosphere. *Annual Revision of Entomology*, 60: 517-535.
- Kaya H. y S. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. (43 p). In L. A. Lacey. Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, CA. Academic Press. 281 – 324. (Biological Techniques Series).
- Kaya, H. y R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Revision of Entomology*, 38: 181-206.
- Laznik, Z y S. Trdan. 2015. The role of volatiles substances emitted by cultivated plant's root in indirect defenses against soil herbivore. [en línea] Croacia. InTech. Recuperado en: <<https://www.intechopen.com/books/insecticides-resistance/the-role-of-volatile-substances-emitted-by-cultivated-plant-s-roots-in-indirect-defense-against-soil>>
- Navarro, F., E. Saini y P. Leiva. 2009. Clave pictórica de polillas de interés agrícola. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Rasmann, S., T. Köller, J. Egenhardt, I. Hiltpold, S. Toepfer, I. Kuhlmann, J. Gershenzon y T. Turlings. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434: 732-737.

- Rosero, M. 2011. Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia* (F) (Hemiptera, Cercopidae). Trabajo de grado para Magíster en Ciencias Agrarias, énfasis en Protección de Cultivos. Palmira, Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. 80 p.
- Turlings, T y I. Hiltbold. 2012. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant and soil*, 358: 51–60.
- Turlings, T and F. Wäckers. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants (cap. 2, pp.21-75). En: Cardé, R. y J. Millar (Ed.). *Advances in Insect Chemical Ecology*. California, USA. University of California at Riverside. 333 p.
- Turlings, T., J. Tumlinson, R. Heath, A. Proveaux y R. Doolittle. 1991. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of chemical ecology*. 17(11): 2235-2251.
- Vidal, G. 2014. Efecto de la textura del suelo sobre la capacidad de desplazamiento e infectividad en laboratorio de *Steinernema* sp. aislamiento Licán Ray. Tesis Ingeniera Agrónoma y Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 55 p.
- Vivanco, J., E. Cosio, V. Loyola-Vargas y H. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 341: 68-75.
- Weissteiner, S. 2010. The effect of root volatiles on the orientation behavior of cockchafer larvae in the soil. Tesis Doctor en Ciencias Forestales. Göttingen, Alemania: Facultad de ciencias forestales y ecología forestal, Universidad Georg-August. 182 p.