

**COMPARACION EN LABORATORIO DE LA PATOGENICIDAD DE TRES
ESPECIES NATIVAS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (RHABDITIDA)
SOBRE LARVAS DE TERCER INSTAR DE *Phyllophaga menetriesi*
(BLANCHARD) (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE)**

MARIA PAULINA QUINTERO MARIN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar al título de Bióloga

Director
JAMES MONTOYA L
Biólogo, Ph. D

Codirector
ANDREAS GAIGL
Agrónomo, Ph. D

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA ACADEMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2003

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado “**Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae)** presentado por la estudiante MARIA PAULINA QUINTERO MARIN, para optar al título de Bióloga, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

James Montoya L.
Director

Andreas Gaigl
Codirector

Jurado

Dedico a:

Mi familia,
especialmente mi madre Carmen Gloria, a
quien debo mi vida, mis logros y todo lo que
soy, a mis abuelos y tías, por su amor y apoyo
en los momentos más críticos.

Juan Miguel por su constante e incondicional
apoyo, amor y comprensión.

Mis agradecimientos más sinceros:

Al Dr. Andreas Gaigl por financiar y apoyar este proyecto

Al Dr. James Montoya L. por su acertada dirección, confianza, colaboración y amistad

A Ana Milena Caicedo por su invaluable apoyo y orientación, su sincera amistad y valiosos consejos

A Myriam Cristina Duque por su incondicional colaboración, amistad y por su importantísimo aporte estadístico a la presente investigación

A Luis Carlos Pardo por su valiosa colaboración en la identificación y adquisición de las larvas de escarabajo

A Juan Carlos López por toda su colaboración y disponibilidad

A Arturo Carabalí y Maria Elena Cuellar por su cálida amistad y permanente estímulo

A Josefina Martínez y en general a todo el personal de Entomología de Yuca por su colaboración

A mis profesores por su aporte en mi construcción personal y profesional

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de la presente investigación

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	4
2.1 Insectos Plagas de Suelo	4
2.1.1 Métodos de Control	7
2.2 Nematodos Entomopatógenos	8
2.2.1 Taxonomía y Sistemática	11
2.2.2 Ciclo Biológico	13
2.2.3 Nematodos vs Escarabajos Plaga	15
2.3 Insectos Plaga de Suelo en Colombia	16
2.3.1 Los Escarabajos Plaga: <i>Phyllophaga menetriesi</i>	18
3. MATERIALES Y METODOS	21
3.1 Sitio de Estudio	21
3.2 Material Biológico	21
3.2.1 Nematodos	21
3.2.2 Los Insectos	23
3.3 Diseño Experimental	24
3.4 Bioensayos	25
3.4.1 Susceptibilidad de las Larvas a los Nematodos	25
3.4.2 Patogenicidad de los Nematodos	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Patogenicidad de los Nematodos y su Atracción hacia las Larvas de <i>P. menetriesi</i>	28
4.2 Susceptibilidad de las Larvas de <i>P. menetriesi</i> a los Nematodos Nativos	28
4.2.1 Porcentaje de Penetración	28
4.2.2 Porcentaje de Mortalidad	31
4.3 Portal de Entrada y Supervivencia de los Nematodos	37
5. CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Ciclo de vida general de los nematodos entomopatógenos (Ehlers 2001)	14
FIGURA 2: Ciclo de vida de <i>Phyllophaga menetriesi</i> (Andrews 1984)	19
FIGURA 3: Larvas de tercer instar de <i>P. menetriesi</i> (King & Saunders 1984)	20
FIGURA 4: Adulto de <i>P. menetriesi</i> (King & Saunders 1984)	20
FIGURA 5: Reproducción <i>in vivo</i> de nematodos sobre larvas de <i>G. mellonella</i> . A, incubación en cajas de petri; B, trampa de cosecha tipo “white”	22
FIGURA 6: Cuarto de cuarentena	24
FIGURA 7: Larva individualizada	24
FIGURA 8: Montaje de los bioensayos	25
FIGURA 9: Almacenamiento de las unidades de muestreo	25
FIGURA 10: Larva muerta en cámara húmeda	26
FIGURA 11: Control positivo de los bioensayos, larvas de <i>G. mellonella</i>	26
FIGURA 12: Porcentaje global de penetración de larvas de tercer instar de <i>P. menetriesi</i> por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_CIAT) , con dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml) y dos tiempo de evaluación (5 y 10 días)	29
FIGURA 13: Comparación del porcentaje de penetración de larvas de tercer instar de <i>P. menetriesi</i> entre dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días), por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_CIAT) en dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml). A , es el porcentaje de penetración a los 10 días (80%); B porcentaje global (74.5%) y C porcentaje a los 5 días de evaluación (68.9%)	31
FIGURA 14: Porcentaje global de mortalidad de larvas de tercer instar de <i>P. menetriesi</i> por tres especies de nematodos nativos, dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml) y en dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días)	33

- FIGURA 15: Comparación del porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *P. menetriesi* entre dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días), por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_CIAT) en dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml). **A**, es el porcentaje de mortalidad a los 5 días (13.1%); **B** porcentaje global (10.5%) y **C** porcentaje a los 10 días (8%) 35
- FIGURA 16: Porcentaje de parasitismo y mortalidad de los dos tratamientos de nematodos que más penetraron las larvas de *P. menetriesi* y las que causaron mayor mortalidad 36
- FIGURA 17: Disección cabeza de larva de *P. menetriesi*. **A**, gula; **B**, mandíbula 37
- FIGURA 18: Nematodos muertos a partir de chisa disectada 38
- FIGURA 19: Fotografía microscópica de nematodos muertos 39

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Principales plagas de suelo de Centro y Sur América (Modificada de Coto <i>et al.</i> 1995)	5
TABLA 2: Principales géneros de coleópteros plaga, países y cultivos afectados (Londoño & Pérez 1994, Sánchez & Vásquez 1996, Shannon & Carballo 1996, Londoño & Ríos 1997, Koppenhöfer & Fuzy 2003, García <i>et al.</i> 2003)	6
TABLA 3: Asociaciones mutualistas entre nematodos y bacteria simbioses (Modificada de Akhurst & Boemare (1990), Boemare (2002))	10
TABLA 4: Especies reconocidas de <i>Steinernema</i> y sus sinónimos (Modificada de Poinar (1990), Adams & Nguyen (2002))	11
TABLA 5: Especies reconocidas de <i>Heterorhabditis</i> y sus sinónimos (Modificada de Poinar (1990), Adams & Nguyen (2002))	13
TABLA 6: Steinernemátidos aislados a partir de escarabajos (modificado de Poinar (1992))	15
TABLA 7: Heterorhabditidos aislados a partir de escarabajos (modificado de Poinar (1992))	16
TABLA 8: Especies de nematodos empleados en bioensayos contra escarabajos plaga	17
TABLA 9: Número de chisas con nematodos en cada sección del cuerpo, se separan el número de chisas con nematodos vivos y muertos	38

RESUMEN

Se evaluó y comparó la patogenicidad (medida en porcentaje de penetración y mortalidad) de tres nematodos nativos, *Heterorhabditis* sp. (HNI 0100 y CIAT) y *Steinernema* sp. (SNI 0198) contra larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* bajo condiciones de laboratorio. Los tratamientos fueron cada especie de nematodo en dos concentraciones (7 000 y 13 000 IJ/ml) y dos tiempos de evaluación (5 y 10 días). El porcentaje global de penetración fue de 74.5%, siendo los tratamientos con *Steinernema* sp. los que presentaron los más altos valores (>80%). La mortalidad global fue baja (10.5%), la especie que causó la mayor mortalidad (20-30%) fue *Heterorhabditis* sp. (HNI 0100).

Con base en los resultados e información adicional obtenida en la literatura científica se postula que la cepa de *Steinernema* evaluada se trata de *S. glaseri* o una especie muy cercana a ella.

1. INTRODUCCIÓN

Las larvas de escarabajos de la superfamilia Scarabaeoidea conocidas como chisas, mojarros, gallinas ciegas, o mojojeyes, son consideradas mundialmente como insectos-plagas de gran importancia económica, puesto que se alimentan directamente de las raíces de diversos cultivos, afectando su desarrollo y ocasionando en muchos casos hasta la muerte de las plantas.

Las especies más voraces y dañinas se encuentran dentro de los géneros *Anomala*, *Popillia*, *Macrodactylus*, *Cyclocephala*, *Strategus* y *Phyllophaga*. Este último, se considera como una de las principales plagas debido a su gran rango de hospederos y su amplia distribución latitudinal (Centro y Sur América) y altitudinal (1 800-2 500 msnm) (King & Saunders 1984, Sánchez & Vásquez 1996).

En Colombia, *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) ha sido reportada en las zonas agrícolas de clima frío atacando diversos cultivos de importancia económica como cereales, hortalizas, frutales, tuberosas, flores, forrajes, arvenses y forestales (Posada 1993, Londoño 1998, Madrigal 2003). El tercer estadio larval es el más dañino al permanecer más tiempo alimentándose de las raíces principales de las plantas, y por lo tanto, es sobre éste en el que se han centrado los esfuerzos de control químico y biológicos.

Dentro del control biológico, sobre larvas de escarabajo-plaga, se han evaluado diferentes especies de nematodos entomopatógenos, de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estas familias se caracterizan por estar asociadas a bacterias simbiotas que matan rápidamente al insecto parasitado.

Debido a esta asociación simbiótica, a su amplio rango de hospederos, gran capacidad de búsqueda, alta virulencia, su facilidad para ser reproducidos masivamente y porque no ocasionan problemas al ambiente (Klein 1990), los miembros de Steinernetamatidae y Heterorhabditidae han sido clasificados como los agentes de control biológico más promisorios, entre los nematodos entomopatógenos.

A nivel mundial, se han desarrollado investigaciones empleando estas dos familias de nematodos para controlar plagas subterráneas de importancia económica, obteniéndose resultados muy prometedores en el campo del control biológico; e.g. *Cosmopolites sordidus* en cultivos de banano (Rosales & Suárez 1998), *Diaprepes abbreviatus* y *Phyllophaga* spp. en caña de azúcar (Sirjusingh *et al.* 1992), *Phyllopertha horticola* y *Amphimallon solstitialis* en prados (Smits 1992), *Popillia japonica* en campos de golf (Villani & Wright 1988, Grewal *et al.* 2002), *Exomala orientalis*, *P. japónica* y *Cyclocephala borealis* en prados (Koppenhöfer & Fuzy 2003) entre otros.

En Colombia, Amaya & Bustamante (1975) iniciaron el reconocimiento de nematodos como enemigos naturales de las chisas evaluando *Steinernema* (= *Neoplectana*) *carpocapsae* cepa, DD-136, contra larvas de *Premnotrypes vorax*, *Cyclocephala rufficollis* y *Eutheola* sp.. En 1994 Londoño y Pérez, aislaron nematodos entomopatógenos de las familias Rhabditidae y Mermithidae a partir de varias especies de chisas, mientras que Sánchez & Vásquez (1996) aislaron el nematodo *Hexamermis* spp. (Mermithidae) de larvas de *Phyllophaga*, *Anomala*, *Serica* y *Plectris*.

Cabe destacar también otros trabajos como los de Garzón *et al.* (1996) quienes evaluaron *Steinernema* spp. y *S. carpocapsae* cepa 25 (EXHIBIT®) contra *Premnotrypes vorax*; Sáenz & Luque (1999) quienes probaron *S. feltie*, cepa Villapinzón, sobre larvas de *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus*; Londoño (1998) quien empleó *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* contra *P. obsoleta* y Ramírez (2002) quien evaluó la patogenicidad de *Heterorhabditis* spp. sobre larvas de *P. menetriesi*.

El presente trabajo se plantea ante la necesidad de investigaciones que contribuyan a ampliar el conocimiento de los controladores naturales asociados a las larvas de escarabajo-plagas, para lograrlo, la investigación buscó evaluar y comparar en condiciones de laboratorio, la patogenicidad de tres especies de nematodos nativos *Heterorhabditis* sp. (HNI 0100), *Heterorhabditis* sp. (CIAT) y *Steinernema* sp. (SNI 0198) sobre larvas de tercer instar de *P. menetriesi* provenientes de cultivos de yuca y cebolla, de los departamentos de Cauca y Risaralda. Partiendo de la hipótesis de que existen diferencias estadísticamente significativas, entre los diferentes tratamientos (tres especies de nematodos, dos concentraciones de nematodos y dos tiempos de evaluación) y el porcentaje de larvas penetradas y muertas por los nematodos entomopatógenos.

2. MARCO TEORICO

2.1 Insectos Plagas de Suelo

Los insectos plagas del suelo, se constituyen en uno de los mayores limitantes en los agroecosistemas a nivel mundial, generando bajos rendimientos y en muchos casos pérdidas de hasta el 100%. Los principales daños están relacionados con muerte de las semillas y plántulas, escaso desarrollo de las raíces y partes aéreas, alteraciones morfológicas y fisiológicas, marchitez, debilitamiento, volcamiento, acceso de fitopatógenos directa e indirectamente y hasta la muerte (Ríos-Rosillo & Romero-Parra 1982).

Los insectos-plaga del suelo más importantes están distribuidos en tres grupos principales, según su estrategia de alimentación, estos son: minadores que perforan el tallo continuando su alimentación dentro de la planta; succionadores que se alimentan de los fluidos vegetales y los masticadores, los cuales se alimentan trozando las raíces ó cortando al nivel del cuello del tallo de las plantas (**Tabla 1**).

Dentro del último grupo se encuentran las larvas de escarabajos, de las subfamilias Melolonthinae, Dynastinae, Rutelinae y Cetoniinae, orden Coleoptera, consideradas como unas de las principales plagas subterráneas (Morón 1994). Su amplio rango de hospederos incluye cultivos, forestales y arvenses (**Tabla 2**). Los daños se caracterizan por su desigualdad y aparición esporádica y porque son ocasionados, principalmente, por larvas de tercer estadio. Dependiendo de la época del año y del estado del cultivo, el ataque puede ocasionar pérdidas hasta del 80% (Posada 1993).

Tabla 1. Principales plagas de suelo de Centro y Sur América (modificada de Coto *et al.* 1995)

FAMILIA	TIPO DE PLAGA	CULTIVOS AFECTADOS
Curculionidae	Minadores	Caña de azúcar, sorgo, maíz, algodón, plátano, chile, berenjena
Pyralidae	Minadores	Camote, maní, caña de azúcar, sorgo, frijol, tabaco
Cydnidae	Succionadores	Yuca, maní, caña de azúcar, maíz, frijol, algodón, banano, café, tabaco, berenjena
Pseudococcidae	Succionadores	Mango, piña, camote, maní, garbanzo, banano, plátano, café, apio
Chrysomelidae	Masticadores	Cebolla, lechuga, camote, nabo, sandía, uva, melón, pepino, maní, sorgo, trigo, maíz, soya, frijol, arveja, espárrago, algodón, banano, chile, ajonjolí, remolacha, espinaca, tomate, tabaco, berenjena, papa, zanahoria
Curculionidae	Masticadores	Piña, camote, yuca, maní, caña de azúcar, trigo, maíz, frijol, banano, plátano, café, cítricos, chile, papa
Gryllidae	Masticadores	Cebolla, repollo, maní, caña de azúcar, maíz, garbanzo, frijol, ajonjolí, café, tomate, tabaco
Scarabaeidae	Masticadores	Ajo, piña, lechuga, camote, repollo, melón, yuca, maní, cebada, sorgo, caña de azúcar, trigo, maíz, soya, frijol, espárrago, plátano, remolacha, fresa, manzana, pera, café, cítricos, chile, tomate, tabaco, papa, uva, zanahoria, arracacha, ciprés, pino, ceiba

Tabla 2. Principales géneros de coleópteros rizófagos, por países y cultivos afectados (Fuentes: Londoño & Pérez 1994, Sánchez & Vásquez 1996, Shannon & Carballo 1996, Londoño & Ríos 1997, Koppenhöfer & Fuzy 2003, García *et al.* 2003)

GENERO	PAIS	CULTIVOS ATACADOS
<i>Anomala</i>	México, Honduras, Panamá, El Salvador Colombia Estados Unidos	Maíz, frijol Arracacha, yuca, pastos, hortalizas, frijol, maíz, lulo, granadilla, flores, mora, guayaba, eucalipto Prados de golf, pastizales, ornamentales
<i>Cyclocephala</i>	Honduras, El Salvador México Colombia Estados Unidos	Maíz, sorgo-maíz Maíz, frijol, caña de azúcar, alfalfa Arracacha, papa Prados de golf, pastizales, ornamentales
<i>Macroductylus</i>	Honduras, México Colombia	Papa, maíz Maíz, frutales, frutas, hortalizas, remolacha, zanahoria, papa, frijol, arracacha, pasto, trigo
<i>Popillia</i>	Estados Unidos	Prados de golf, fresa, ornamentales, frutales
<i>Phyllophaga</i>	Estados Unidos México Colombia Guatemala Nicaragua Costa Rica Panamá, El Salvador Honduras	Avena, trigo, cebada, sorgo, leguminosas Caña de azúcar, maíz, leguminosas, plátano, café, frijol, trigo, alfalfa Yuca, café, remolacha, zanahoria, papa, frijol, repollo, habichuela, arracacha, maíz, pastos, flores, frutales Frijol, maíz, sorgo, espárrago, arveja, hortalizas, rosas Papa, granos básicos, pastos, café Maíz, yuca, arroz, frijol, papa, caña de azúcar, espárrago, ciprés, sábila, brócoli, remolacha, manzana, fresa Maíz, arroz, frijol, piña, café Maíz, sorgo, frijol, chile, cebolla, repollo, ajo

Los géneros más adaptables y eurífagos de estas subfamilias, son *Anomala*, *Popillia*, *Macroductilus*, *Cyclocephala*, *Strategus* y *Phyllophaga*. En la literatura se ha reportado que todos los estados del ciclo de vida de estos escarabajos son susceptibles al ataque de enemigos naturales como vertebrados, hongos, bacterias, virus, protozoos y nematodos, motivando el estudio enfocado hacia el control biológico de estas plagas.

2.1.1. Métodos de Control

Las estrategias empleadas para el control de estas importantes y limitantes plagas, se pueden reunir en dos grupos: las de tipo tradicional ó químico y las alternativas o limpias (sin químicos). Las primeras incluyen tanto el uso de insecticidas como de otros químicos (i.e. atrayentes o repelentes) (Bosque-Pérez 1992). Sin embargo, su uso indiscriminado ha generado problemas de resistencia en los insectos, el surgimiento de nuevas plagas y contaminación por sus efectos residuales en fuentes de agua, suelos y alimentos, afectando la calidad de vida de humanos y animales.

Las estrategias alternativas comprenden diversos métodos: cultural, físico, genético y biológico, las cuales, a su vez, pueden articularse en otras prácticas como el control cultural que incluye tácticas agronómicas tales como uso de fechas y densidades de siembra, rotación de cultivos, recolección de residuos y manejo de arvenses.

Dentro de los métodos físicos se encuentran las barreras naturales como árboles y ríos y las trampas atrayentes (feromonas, luz, cebos, etc.). El control genético se ha basado principalmente en el desarrollo de resistencia vegetal, permitiendo a la planta evitar, minimizar y/o tolerar el daño causado por los insectos (Londoño 1998, Bosque-Pérez

1992). Finalmente, el control biológico incluye la acción de enemigos naturales (parasitoides, predadores y microorganismos entomopatógenos) y abarca tanto agentes de ocurrencia natural como introducidos.

Entre los primeros se destacan los ectoparasitoides de larvas de las familias Tiphidae y Scoliidae (Hymenoptera) (King & Saunders 1984, Andrews 1984) Tachinidae, Bombyliidae y Asilidae (Diptera) (López 2001). Los principales depredadores, según King & Saunders (1984), son los vertebrados como aves y anuros, mientras que López (2001) menciona a *Conoderus* sp. (Coleoptera: Elateridae). Los microorganismos incluyen principalmente géneros de los hongos *Metarrhizium* y *Beauveria*, entre las bacterias *Bacillus* sp y *Serratia* sp y los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Rhabditida) (Tanada & Kaya 1993).

2.2 Nematodos Entomopatógenos

Los nematodos son gusanos cilíndricos no segmentados, que poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la epidermis seguida por las fibras musculares longitudinales, carecen de peritoneo, razón por la cual se incluyen dentro de los pseudocelomados. Tienen sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero sin sistema circulatorio y respiratorio (Kaya & Stock 1997).

Algunas especies se encuentran asociadas a insectos, en relaciones que van desde fortuitas hasta parasíticas. Estas últimas, puede ocasionar diferentes efectos deletéreos sobre sus hospederos, que pueden ir desde reducción en la fecundidad, esterilidad y

longevidad, disminución en la actividad, retraso en el desarrollo, cambios fisiológicos, morfológicos y de comportamiento (Poinar 1979) y hasta la muerte.

Existen ocho familias de nematodos reconocidas como parásitos de insectos, estas son: Allantonematidae, Diplogasteridae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerularidae, Tetradonematidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (Sáenz 1999). Las dos últimas, están relacionadas con una bacteria simbiote que mata al hospedero rápidamente, razón por la cual han despertado gran interés mundial para ser desarrolladas como biocontraladores de insectos plaga. La bacteria simbiote pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se han reconocido dos géneros *Xenorhabdus* en asocio con Steinernematidae y *Photorhabdus* con Heterorhabditidae (**Tabla 3**).

Las células de la bacteria simbiote, son llevadas por los nematodos infectivos, en la porción ventricular de su intestino. Una vez es encontrado un insecto hospedero apropiado, el nematodo lo penetra por sus aberturas naturales (boca, ano, espiráculos), llegando hasta el hemocele, en donde libera la bacteria, la cual se propaga, matando al hospedero por septicemia, en 48 horas (Kaya & Stock 1997).

En esta simbiosis obligada, la bacteria mata al insecto hospedero, produce compuestos antimicrobianos como Xenorhabdinas y Xenocoumacinas (Akhurst & Boemare 1990) que evitan la competencia con otros microorganismos, degrada el tejido del insecto en nutrientes asimilables y sirve como fuente de alimento para el nematodo, siendo esta la manera como los juveniles obtienen las células bacterianas antes de salir en busca de un nuevo hospedero.

A su vez, el nematodo transporta la bacteria simbiote, la protege del medio exterior y de las proteínas antibacteriales del sistema inmune del insecto (Kaya & Gaugler 1993).

Tabla 3. Asociaciones mutualistas entre nematodos y bacteria simbiote (modificada de Akhurst & Boemare (1990) y Boemare (2002)).

Especie de Nematodo Asociado	Especie de Bacteria
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
<i>S. feltie</i> (=bibionis)	<i>X. bovienii</i>
<i>S. kraussei</i>	
<i>S. affinis</i>	
<i>S. intermedia</i>	
<i>Steinernema</i> spp. F3	
<i>Steinernema</i> spp. F9	
<i>S. glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>Steinernema</i> spp. NC513	
<i>Steinernema</i> spp. M	<i>X. beddingii</i>
<i>Steinernema</i> spp. N	
<i>S. rara</i>	<i>Xenorhabdus</i> spp.
<i>S. arenarium</i>	<i>Xenorhabdus</i> spp.
<i>S. kushidai</i>	<i>X. japonica</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>H. indica</i>	
<i>H. zealandica</i>	<i>P. temperata</i>
<i>H. bacteriophora</i> grupo NC	
<i>H. megidis</i> Grupo Neártico	
<i>H. megidis</i> Grupo Paleártico	

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, han sido ampliamente estudiados como potenciales biocontroladores de chizas rizófagas, debido a su amplio rango de hospederos, gran capacidad de búsqueda, alta virulencia, su facilidad para ser reproducidos masivamente y sobretodo, porque no ocasionan problemas al ambiente (Klein 1990).

2.2.1 Taxonomía y Sistemática

En la actualidad, se han aislado varias especies y cepas de nematodos, a partir de muestras de suelo e insectos infectados. A continuación se listan las especies de steinernematidos (**Tabla 4**) y heterorhabditidos (**Tabla 5**) identificados hasta el año 2002.

Tabla 4. Especies reconocidas de *Steinernema* y sus sinónimos (modificado de Poinar (1990) y Adams & Nguyen (2002))

**Especies originalmente descritas
en el género *Neoaplectana* excepto
kushidai y *scapterisci*)**

Sinónimos

<i>abbasi</i> Ielawad, Ahmad y Reid, 1997	_____
<i>affine</i> (Bovien, 1937) Wouts, Gerdin y Bedding, 1982	_____
<i>arenarium</i> (Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	<i>N. arenaria</i> Artyukhovsky, 1967 <i>N. anomali</i> Kozodoi, 1984 <i>N. anomalae</i> (Kozodoi, 1984) Curran, 1989
<i>bicornutum</i> Tallosi, Peters y Ehelers, 1995	_____
<i>bibionis</i> (Bovien, 1937) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	_____
<i>carpocapsae</i> (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	<i>N. carpocapsae</i> Weiser, 1955 <i>N. belorussica</i> Veremchuk, 1966
<i>carpocapsae</i> (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	<i>N. chresima</i> Steiner en Glaser, McCoy & Girth, 1942 <i>N. dutkyi</i> Turco <i>et al.</i> , 1971 <i>N. dutkyi</i> Jackson, 1965 <i>N. dutkyi</i> Welch, 1963 <i>N. elateridicola</i> Veremchuk, 1970 <i>N. semiothisae</i> Veremchuk & Litvinchuk, 1971 <i>N. agriotos</i> Veremchuk, 1969 <i>N. feltie</i> Filipjev <i>sensu</i> Stanuszek, 1974
<i>caudatum</i> Xu, Wang y Li, 1991	_____
<i>ceratophorum</i> Jian, Reid y Hunt, 1997	_____
<i>cubanum</i> Mracek, Hernandez y Boemare, 1994	_____

(**continuación**) **Tabla 4.** Especies reconocidas de *Steinernema* y sus sinónimos (modificado de Poinar (1990) y Adams & Nguyen (2002))

**Especies originalmente descritas
en el género *Neoaplectana* excepto
kushidai y *scapterisci*)**

Sinónimos

<i>feltie</i> (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	<i>N. bibions</i> Bovien, 1937 <i>N. bothynoderi</i> Kirjanova y Puchkova, 1955 <i>N. feltie</i> Filipjen, 1934 <i>N. georgica</i> Kakulia y Veremchuk, 1965 <i>N. kirjanovae</i> Veremchuk, 1969 <i>N. leucaniae</i> Hoy, 1954 <i>N. menozzii</i> Travassos, 1935
<i>glaseri</i> (Steiner, 1929) Wouts, Mracek, Gerdin y Bedding, 1982	<i>N. glaseri</i> Steiner, 1929
<i>intermedium</i> (Poinar, 1985) Mamiya, 1988	<i>N. intermedia</i> Poinar, 1985
<i>kari</i> Waturu, Hunt y Reid, 1997	_____
<i>kushidai</i> Mamiya, 1988	_____
<i>kraussei</i> (Steiner, 1923) Travassos, 1927	<i>Aplectana kraussei</i> Steiner, 1923
<i>longicaudum</i> Shen y Wang, 1991	_____
<i>neocurtillae</i> Nguyen y Smart, 1992	<i>S. neocurtillis</i> Nguyen y Smart, 1992
<i>oregonense</i> Liu y Berry, 1996	<i>S. oregonensis</i> Liu y Berri, 1996
<i>puertoricense</i> Roman y Figueroa, 1994	<i>S. puertoricensis</i> Roman & Figueroa, 1994
<i>rarum</i> (Doucet, 1986) Mamiya, 1988	<i>S. rara</i> Doucet, 1986
<i>riobravus</i> Cabanillas, Poinar y Raulston, 1994	_____
<i>ritteri</i> Doucet y Doucet, 1990	_____
<i>scapterisci</i> Nguyen y Smart, 1990	<i>N. carpocapsae</i> , cepa Uruguay Nguyen y Smart, 1988
<i>siamkayai</i> Stock, Somsook y Reid, 1998	_____
<i>tami</i> Luc, Nguyen, Reid y Spiridonov, 2000	_____

Tabla 5. Especies reconocidas de *Heterorhabditis* y sus sinónimos (Poinar (1990), Adams & Nguyen (2002))

Especies	Sinónimos
<i>argentinensis</i> Stock, 1993 <i>bacteriophora</i> Poinar, 1975	<i>heliothidis</i> (Khan, Brooks y Hirschmann, 1976) <i>Cromonema heliothidis</i> Khan, Brooks & Hirschmann, 1976
<i>brevicaudis</i> Liu, 1994 <i>hawaiiensis</i> Gardner, Stock y Kaya, 1994 <i>indica</i> Poinar, Karunakar y David, 1992 <i>marelatus</i> Liu y Berry, 1996 <i>megidis</i> Poinar, Jackson y Klein, 1987 <i>zealandica</i> Poinar, 1990	_____ _____ _____ <i>hepialius</i> Stock, 1997 _____ Poblaciones de Nueva Zelanda <i>H. heliothidis sensu</i> Wouts, 1979

2.2.2 Ciclo Biológico

El ciclo de vida de los nematodos es simple; consta de huevo, cuatro estados juveniles, separados por mudas, y adulto (Woodring & Kaya 1998).

En las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, el tercer estado juvenil (J3 o IJ) es la única forma de vida libre. En esta etapa el nematodo, contiene reservas de energía en forma de carbohidratos, que les sirve de alimento y su cuerpo está protegido por la cutícula de la anterior etapa (J2), brindándole resistencia a las condiciones del medio ambiente a las que se ve expuesto al salir en busca de un nuevo hospedero (Woodring & Kaya 1998).

Una vez es encontrado el insecto hospedero apropiado, es penetrado por los IJ a través de las aberturas naturales. Estas formas llegan hasta el hemocele y liberan las células bacterianas. Los nematodos se alimentan, maduran hasta adulto y producen varias

generaciones, hasta que la calidad nutricional del cadáver se deteriora, iniciándose en este momento, el desarrollo de infectivos juveniles (IJ), finalmente, estos emergen en busca de un nuevo hospedero (Kaya & Koppenhöfer 1999). (**Figura 1**)

Aunque el ciclo de vida de los steinernematidos y los heterorhabditidos es muy similar, existen diferencias entre ellos. La más importante es que los adultos que resultan de los infectivos juveniles de Heterorhabditidae a diferencia de Steinernematidae son hermafroditas. Por lo tanto, es suficiente que entre sólo un individuo para que prosiga la reproducción.

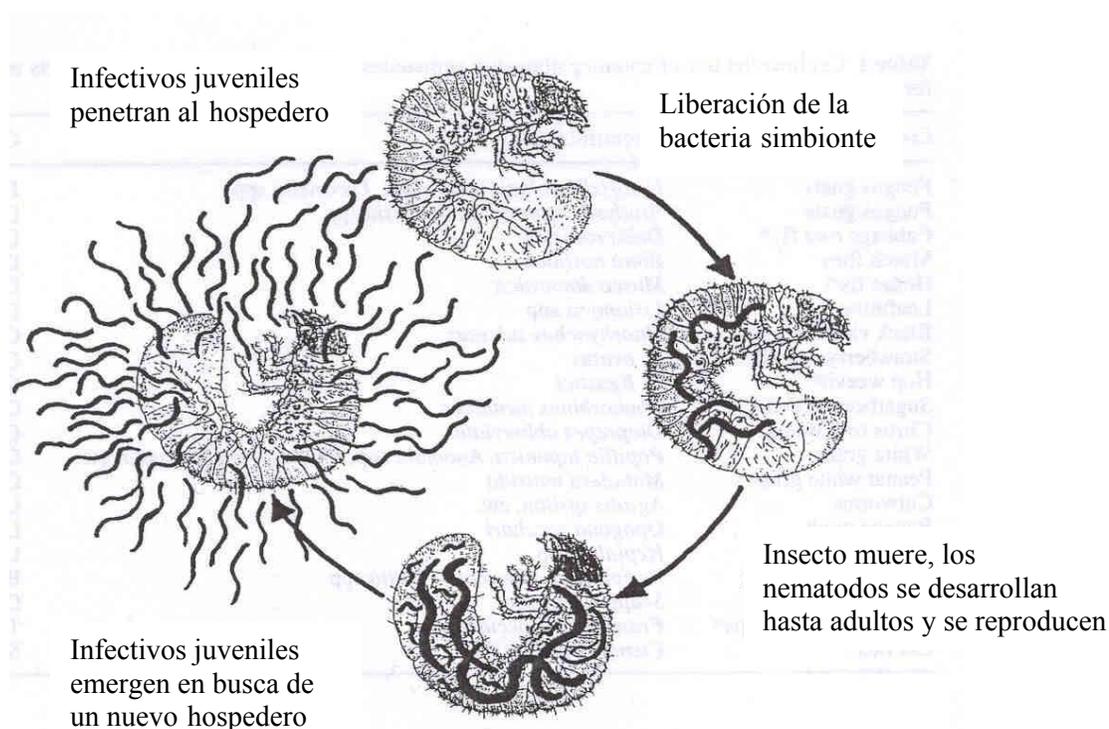


Figura 1. Ciclo de vida general de los nematodos entomopatógenos (Ehlers 2001)

2.2.3 Nematodos vs. Escarabajos Plaga

Desde 1929, en diferentes partes del mundo, se han registrado aislamientos de especies y cepas de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae a partir de escarabajos (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Steinernemátidos aislados a partir de escarabajos (modificado de Poinar (1992) aunque se incluyen las citas bibliográficas, éstas no fueron consultadas)

Nematodos	Hospedero	Localidad	Referencia
<i>Steinernema anomali</i> (Kozodoi)	<i>Anomala dubia</i> Scop.	Europa	Kozodoi, 1984
<i>S. arenaria</i> (Art.)	<i>Melolontha</i> <i>hippocastani</i> Fab.	Europa	Artyukhovsky, 1967
<i>S. bothynodera</i> (Kirj. y Puch)	<i>M. afflicta</i> Ball.	Europa	Gulyamova, 1973
<i>S. scarabaei</i>	<i>Exomala orientalis</i> Waterhouse	Norte América	Stock & Koppenhöfer, 2003
<i>S. carpocapsae</i> (Weiser)	<i>Popillia japonica</i>	Norte América	Glaser <i>et</i> <i>al.</i> , 1942
<i>S. carpocapsae</i> (Weiser)	<i>P. japonica</i>	Norte América	Jackson & Klein, 1985
<i>S. feltie</i> (Filip)	<i>Onitis alexis</i> Klug	Egipto	Ali <i>et al.</i> , 1973
<i>S. feltie</i> (Filip)	<i>Pentodon algerinum</i> Herbst.	Egipto	Ali <i>et al.</i> , 1973
<i>S. georgica</i> (K. & V.)	<i>Amphimallon</i> <i>solstitialis</i> (L.)	Europa	Kakulia & Verm, 1965
<i>S. glaseri</i> (Steiner)	<i>P. japonica</i>	Norte América	Steiner, 1929
<i>S. glaseri</i> (Steiner)	<i>Strigoderma</i> <i>arboricola</i> (Fab.)	Norte América	Poinar & Brooks, 1977
<i>S. glaseri</i> (Steiner)	<i>Anomala</i> <i>flavipennis</i> Burn.	Norte América	Poinar, 1990
<i>S. kushidai</i> Mamiya	<i>A. cuprea</i> Hope	Japón	Mamiya, 1988
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Adoryphorus</i> <i>coulini</i> (Burm.)	Australia	Bedding & Akhurst, 1974
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Scitala sericans</i> Erich.	Australia	Bedding & Akhurst, 1974

Tabla 7. Heterorhabditidos aislados a partir de escarabajos (modificado de Poinar (1992) aunque se incluyen las citas bibliográficas éstas no fueron consultadas)

Nematodos	Hospedero	Localidad	Referencia
<i>Heterorhabditis</i>	<i>P. japonica</i> Newm.	Norte América	Poinar, 1990
<i>Bacteriophora</i> Poinar	<i>Cyclocephala hirta</i>	Norte América	Poinar, 1990
	<i>Phyllophaga</i> sp.	Norte América	Poinar & Georgis, 1990
<i>H. megidis</i> Poinar, Jackson & Klein	<i>P. japonica</i> Newm.	Norte América <i>al.</i> ,1987	Poinar <i>et</i>
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>P. japonica</i> Newm.	Norte América	Poinar, 1990
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>Pericoptus</i> <i>truncatus</i> (F.)	Nueva Zelanda	Jackson, 1990
<i>H. zealandica</i> Poinar	<i>Heteronychus</i> <i>arator</i> (F.)	Nueva Zelanda	Wouts, 1979; Poinar, 1970

Evaluaciones a nivel de laboratorio, invernadero y campo, han revelado aspectos sobre la biología de ciertas especies y cepas de nematodos que las hacen más exitosas contra especies de escarabajos plagas, en la **Tabla 8** se mencionan algunos de estos trabajos.

2.3 Insectos Plaga de Suelo en Colombia

En Colombia, Bellotti *et al.* (1997) registran como principales plagas de suelo a la chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froechner (Hemiptera:Cydnidae) y a las chisas ó larvas de escarabajos (Coleoptera:Scarabaidae).

Dentro de los programas de control biológico de estas importantes plagas, entre 1994 y 1995 y recientemente en 2003, se han evaluado diferentes especies y cepas de nematodos entomopatógenos, introducidos y nativos, sobre todos los estados de desarrollo de *C. bergi*, encontrando que el V instar ninfal y el adulto son los estados mas susceptibles (Caicedo & Bellotti 1994, CIAT 1995).

Tabla 8. Especies de nematodos empleados en bioensayos contra escarabajos plaga.

Nematodos	Escarabajos plaga	Referencia
<i>H. heliothidis</i>	<i>R. majalis</i>	Villani & Wright, 1988
	<i>P. japonica</i>	
<i>H. bacteriophora</i> (HP88)	<i>Maladera matrida</i>	Glaser & Gol'berg, 1989
<i>H. heliothidis</i>		
<i>S. carpocapsae</i>		
<i>S. glaseri</i>	<i>Phyllophaga hirticula</i>	Forschler & Gardner, 1991
<i>Heterorhabditis</i> spp.	<i>Melolontha melolontha</i>	Deseö <i>et al.</i> , 1992
<i>Heterorhabditis</i> (HE-87.3)	<i>Phyllopherta horticola</i>	Smits, 1992
<i>H. bacteriophora</i> HP88		
<i>H. bacteriophora</i> NJ-2		
<i>S. glaseri</i> NC		
<i>S. glaseri</i> NJ-43	<i>P. japonica</i>	Selvan <i>et al.</i> , 1993
<i>S. glaseri</i> NJ-43		
<i>S. glaseri</i> SI-12	<i>P. japónica</i>	Selvan <i>et al.</i> , 1994
<i>S. glaseri</i>	<i>Cyclocephala hirta</i>	Converse & Grewal, 1998
<i>S. kushidai</i>	<i>Anomala cuprea</i>	Fujiie, 1996
<i>H. megidis</i>		
<i>H. bacteriophora</i>	<i>Aphodius</i> sp., <i>P. horticola</i>	Ehlers <i>et al.</i> , 1996
<i>H. bacteriophora</i>		
<i>S. glaseri</i>		
<i>S. feltiae</i>		
<i>S. carpocapsae</i>	<i>Cotinis nitida</i>	Townsend <i>et al.</i> , 1998
<i>S. glaseri</i>		
<i>H. bacteriophora</i>	<i>P. japónica</i>	Wang & Gaugler, 1999
<i>H. zealandica</i>	<i>P. japonica</i>	
	<i>C. borealis</i>	Grewal <i>et al.</i> , 2002
<i>S. scarabae</i>	<i>P. japonica</i>	
	<i>Exomala orientalis</i>	
	<i>Rhizotrogus majalis</i>	
	<i>C. borealis</i>	Koppenhöfer & Fuzy, 2003

Mientras que en chisas se han registrado trabajos con los nematodos *S. feltie*, cepa Villapinzón, sobre larvas de *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus* (Sáenz & Luque 1999); *Steinernema* spp. y *S. carpocapsae*, cepa 25 (EXHIBIT®), contra *Premnotrypes vorax* (Garzón *et al.* 1996); *Hexamermis* spp. (Mermithidae) aislados a partir de larvas de

Phyllophaga, *Anomala*, *Serica* y *Plectris* (Sánchez & Vásquez 1996); Rhabditida y Mermithidae encontrados en varias especies de chisas (Londoño & Pérez 1994); *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* evaluados sobre *P. obsoleta* (Londoño 1998) y *Heterorhabditis* spp. probado sobre larvas de *P. menetriesi* (Ramírez 2002).

2.3.1 Los Escarabajos Plaga: *Phyllophaga menetriesi*

Las especies de chisas más abundantes y voraces en Colombia se encuentran en los géneros *Anomala*, *Popillia*, *Macroductylus*, *Cyclocephala*, *Strategus* y *Phyllophaga* (Bellotti *et al.* 1997, Pardo 1994). Estas se registran en las zonas cafeteras y de clima frío moderado de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño (Ritcher 1958), Valle, Quindío, Tolima, Cauca (Pardo 2000), Huila (Yepes *et al.* 2000) y Risaralda (Pardo com. pers.).

Según Andrews (1984), *Phyllophaga* es el género más importante de todas las chisas fitófagas. A nivel nacional, se ha reportado atacando diversos cultivos, como cereales (trigo, cebada, avena, maíz, sorgo y arroz); hortalizas, incluyendo lechuga, cebolla, repollo y zanahoria; frutales como lulo, tomate de árbol, cítricos y aguacate; tuberosas como papa y yuca; cucurbitáceas; flores; caña de azúcar; café; plantas forrajeras y prados, además de especies forestales como ceiba, ciprés, pino calentano, eucalipto, entre otras (Posada 1993, Londoño 1998, Madrigal 2003).

Phyllophaga menetriesi es una especie cosmopolita, distribuida desde Guatemala hasta Sur América (King & Saunders 1984). En Colombia ha sido registrada atacando diferentes

cultivos en los departamentos de Cauca, Risaralda, Quindío (Pardo 2000) y Tolima (Sánchez & Vásquez 1996).

Vulgarmente se le conoce como abejón de mayo, gallina ciega, joboto, jogoto o chisa.

Tiene un ciclo de vida univoltino (**Figura 2**) destacándose el tercer estadio como el más voraz (**Figura 3**) al consumir las raíces de las plantas hospederas desde fines de junio hasta octubre. Los adultos emergen durante enero y marzo y consumen hojas de árboles como *Eritrina poeppigiana*, *Anona* sp., *Ceiba* sp., *Hibiscus* spp., *Manihot* spp., entre otras (**Figura 4**).

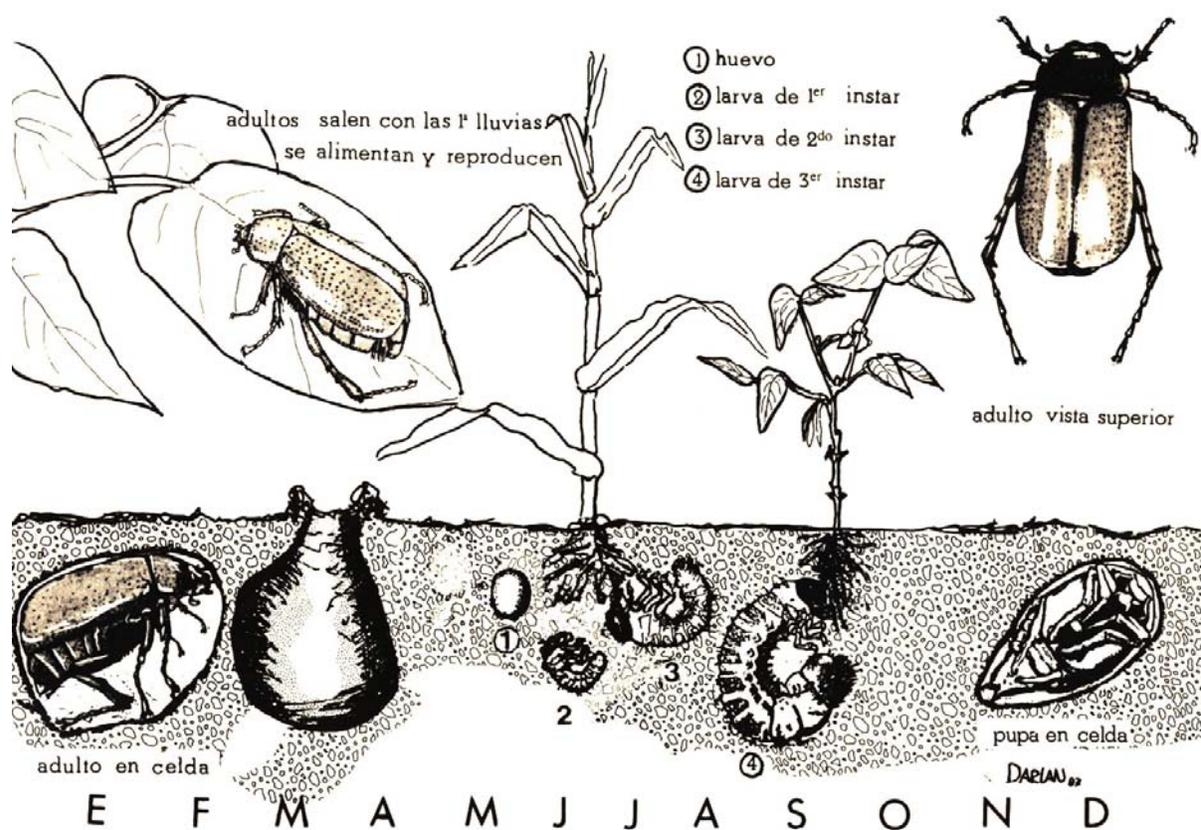


Figura 2. Ciclo de vida de *Phyllophaga menetriesi* (Tomado de Andrews 1984)



Figura 3. Larvas de tercer instar de *P. menetriesi* (Tomado de King & Saunders 1984)



Figura 4. Adulto de *P. menetriesi* (Tomado de King & Saunders 1984)

Debido al creciente registro de larvas de escarabajos, atacando cultivos de importancia económica en diferentes regiones de Colombia, en el año 2002, en CIAT se inició el proyecto “Control Integrado de Plagas Subterráneas en Sur América”, que busca identificar las principales plagas subterráneas, reducir las pérdidas en los cultivos que ocasionan y encontrar una estrategia apropiada para su manejo integrado, evaluando diferentes enemigos naturales, entre los que se incluyen los nematodos entomopatógenos.

El presente trabajo, hace parte de este proyecto, participando en la determinación y comparación de la patogenicidad de tres especies de nematodos entomopatógenos nativos sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi*, en condiciones de laboratorio, como parte de la búsqueda de enemigos naturales de esta importante plaga, para su manejo y control y de esta manera reducir el daño ocasionado en los diferentes cultivos y el uso indiscriminado de insecticidas químicos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Sitio de Estudio

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio del Programa de Entomología de Yuca – Manejo Integrado de Plagas- del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira (Valle del Cauca, Colombia), con temperatura promedio de 23°C y humedad relativa de 65%.

3.2 Material Biológico

3.2.1 Nematodos

Los estadios infectivos (IJs) de los nematodos nativos (*Heterorhabditis* spp HNI 0100 y *Steinernema* spp SNI 0198) fueron facilitados por el Centro Nacional de Investigación del Café (CENICAFE), gracias a la colaboración del microbiólogo Juan Carlos López. Estos nematodos fueron aislados a partir de muestras de suelo de los municipios de Fresno (Tolima) y Montenegro (Quindío), respectivamente.

La especie nativa *Heterorhabditis* spp. CIAT, fue aislada en el municipio de La Florida (Risaralda), a partir de muestras de suelo de cultivos de cebolla.

La identificación de los aislamientos hasta género fue realizada en los laboratorios de CENICAFE y de Entomología de Yuca del CIAT. Muestras de los entomopatógenos fueron enviadas a la doctora Patricia Stock, Universidad de Arizona, Estados Unidos, para su correspondiente identificación hasta especie.

Los nematodos fueron cultivados en larvas de último instar de *Galleria mellonella* a 23°C, en cajas de petri y papel filtro Whatman No.1, (Kaya & Stock 1997) (**Figura 5A**). A partir de las larvas muertas, se recolectaron los infectivos en trampas “White” durante tres días (**Figura 5B**). Posteriormente fueron almacenados máximo por una semana, en frascos de vidrio con formaldehído al 0.05%, en incubadoras a 15°C.



Figura 5. Reproducción *in vivo* de nematodos sobre larvas de *G. mellonella*. A, incubación en cajas de petri; B, trampa “White”.

Las soluciones de nematodos fueron preparadas por dilución 24 horas antes del montaje del ensayo (Kaya & Stock 1997). A partir de la solución madre se tomó un mililitro de nematodos y se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril (ADE). Los conteos se realizaron con 10 submuestras de 50 microlitros bajo el microscopio-esteroscopio, estimándose la concentración de nematodos de la solución madre original, mediante la fórmula:

$$N * 1/M * (x + 1) = S$$

donde, N es el promedio de nematodos por submuestra; M es el número de mililitros de la submuestra; $x + 1$ es la dilución realizada; S es la concentración (nematodos / ml) de la solución madre.

Para preparar las soluciones con las concentraciones deseadas (7 000 y 13 000 nematodos / ml) a partir de la suspensión inicial o suspensión madre, se empleó la fórmula:

$$A = (D * C) / B$$

donde A es el volumen inicial de la suspensión que se desea diluir; B es el número de nematodos por mililitro de esta suspensión; C es el volumen final de la nueva dilución; D es la concentración deseada de la nueva dilución. Siendo C – A la cantidad de agua que debe ser adicionada o restada para obtener la concentración final.

3.2.2 Los Insectos

Las larvas de tercer instar de *P. menetriesi* se colectaron en cultivos de yuca, *Manihot esculenta* y cebolla, *Allium fistulosum*, en los municipios de Pescador (Cauca) y La Florida (Risaralda), durante los meses de julio y agosto de 2003. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio y sometidas a cuarentena por un período de uno a dos meses (Figura 6).

Las larvas fueron individualizadas en vasos plásticos, de 4 onzas con tapa, empleando como sustrato suelo estéril 3:1 (tres partes de materia orgánica por una de arena) y alimentadas con trozos de zanahoria y granos de maíz pregerminado. Cada larva recibía tres granos de maíz o un trozo de zanahoria de 2 cm², aproximadamente, cada ocho días, retirándose el alimento no consumido (Figura 7).



Figura 6. Cuarto de cuarentena



Figura 7. Larva individualizada

3.3 Diseño Experimental

La unidad experimental modificada a partir de la utilizada por Caicedo & Bellotti (1994), Gaugler *et al.* (1994) y Bedding (1990), consistió de cinco vasos desechables de dos onzas con tapa. A cada vaso se le agregó una larva de tercer instar de *P. menetriasi*, 40 g de arena estéril al 5.8% de humedad en peso y un grano de maíz. Un mililitro de la solución de nematodos, fue aplicada en un orificio de 2.5 cm de profundidad, en el centro del sustrato y cubierta con arena (**Figura 8**). Al tratamiento control se le adicionó 1ml de ADE, sin nematodos.

Los vasos fueron rotulados con el código del tratamiento y la fecha y almacenados, en bandejas dentro de bolsas plásticas negras selladas, para mantener la humedad (**Figura 9**), en un cuarto oscuro a 23°C y 65% H.R hasta el momento de la evaluación.

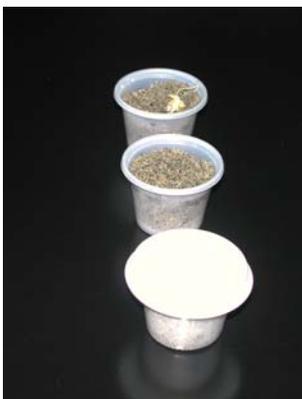


Figura 8. Montaje de los bioensayos.



Figura 9. Almacenamiento de las unidades de muestreo.

3.4 Bioensayos

3.4.1 Susceptibilidad de las Larvas a los Nematodos

Se realizó una evaluación de tres especies de nematodos nativos de acuerdo a lo sugerido por Bedding (1990) para verificar si las larvas de tercer instar de *P. menetriesi* eran susceptibles a los nematodos nativos. Las larvas fueron inoculadas con dos concentraciones (7 000 y 13 000 nematodos /ml) y evaluadas en dos tiempos (5 y 10 días luego de la aplicación). Cada tratamiento, incluyendo el control, contó con cuatro repeticiones en el tiempo para un total de 20 larvas por tratamiento.

A los 5 y 10 días se realizó la evaluación para verificar presencia o ausencia de nematodos, las chisas vivas se lavaron con ADE para comprobar la presencia de nematodos sobre el cuerpo. Posteriormente, las larvas se disectaron en solución salina estéril bajo el microscopio-esteroscopio, dividiéndose en cinco secciones: cabeza, tórax, abdomen 1, abdomen 2 y raster. Se realizó el conteo aproximado del número de nematodos que penetraron en cada segmento, tanto vivos como muertos. Las larvas muertas fueron

conservadas en cámara húmeda (**Figura 10**) y se continuó observándolas dos meses más, hasta el final del ensayo.



Figura 10. Larva muerta en cámara húmeda

Los datos obtenidos, se analizaron por medio de pruebas ji-cuadrado, para determinar la dependencia entre los factores parasitismo y mortalidad y los tratamientos montados (SAS, versión 6.4, 1994)

3.4.2 Patogenicidad de los Nematodos

Antes y después de cada ensayo, se prepararon unidades de muestreo idénticas a las de los tratamientos, pero con cinco larvas de último instar de *G. mellonella* para comprobar la patogenicidad y persistencia de los nematodos empleados (**Figura 11**).



Figura 11. Control positivo de los bioensayos, larvas de *G. mellonella*.

Las larvas se revisaron 48 horas después, registrándose el número de vivas y muertas, estas últimas se trasladaron a una cámara húmeda (caja petri + papel filtro Whatman No.1) para continuar con el desarrollo de los nematodos y su posterior recuperación en trampa “white”.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Patogenicidad de los Nematodos y su Atracción hacia las Larvas de *P. menetriesi*

Antes de la disección, al examinar bajo el estereoscopio el agua con que se lavaron las chisas vivas, se encontró, igual que Forschler & Gardner (1991), gran cantidad de nematodos vivos sobre la superficie de las larvas, confirmando la atracción de los IJs hacia el insecto y su viabilidad a los 5 y 10 días post-inoculación.

Otra manera de confirmar la persistencia de los nematodos, fue con los controles positivos, empleando larvas de *G. mellonella* en el momento del montaje y evaluación de los tratamientos. Este tipo de control, presentó mortalidades del 100% de los insectos a las 48 horas, demostrándose la sobrevivencia y patogenicidad de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo, según lo recomendado por Wright *et al.* (1988).

4.2 Susceptibilidad de las Larvas de *P. menetriesi* a los Nematodos Nativos

4.2.1 Porcentaje de Penetración

Globalmente, el porcentaje de penetración de las larvas fue de 74.5 % (n=247), dependiendo significativamente de los tratamientos aplicados ($\chi^2 = 23$; 11 g.l; P=0.014).

Los tratamientos con *Steinernema* presentaron los más altos valores de penetración siendo iguales o superiores al 80%. El tratamiento SNI-7-10 alcanzó el 100% de penetración (n=23), seguido de SNI-7-5 (91%, n=23), SNI-13-5 (80%, n=20) y SNI-13-10 (78%, n=18). En contraste los tratamientos con *Heterorhabditis* presentaron los menores porcentajes de penetración, siendo el más bajo H_C-13-5 con un valor de 52.9% (n=17) (**Figura 12**).

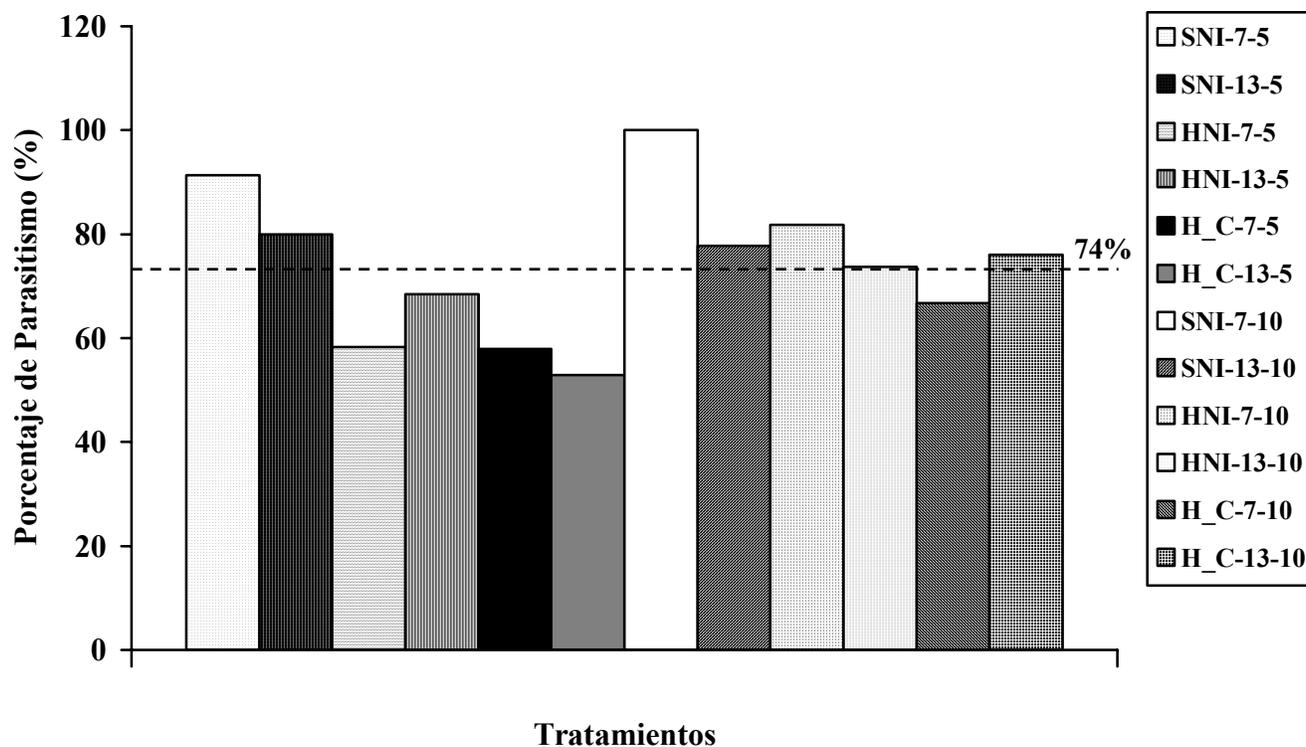


Figura 12. Porcentaje global de penetración de larvas de tercer instar de *P. menetriasi* por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_C IAT), con dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml) y dos tiempo de evaluación (5 y 10 días).

Estos resultados difieren con aquellos registrados en la literatura, en los cuales

Heterorhabditis es el género con mayor posibilidad de penetración gracias a que posee un diente terminal con el que raspa las áreas intersegmentales de la cutícula del insecto, facilitando la entrada al cuerpo del hospedero (Ishibashi & Kondo 1990).

Es importante anotar que Wang & Gaugler (1998), citados por Dowds & Peters (2002), reportan una mayor penetración de *S. glaseri* gracias a la producción de secreciones que

degradan el tejido del insecto. Es posible que la cepa evaluada se trate de una especie cercana a *S. glaseri*, la cual no ha sido registrada para Colombia, por lo tanto es importante lograr la identificación hasta especie del nematodo empleado, para corroborar lo encontrado en 1998 o adicionar una especie más a la lista de steinernematidos que ocasionan altos porcentajes de penetración.

La separación de los tratamientos por fecha de evaluación (**Figura 13**), permite visualizar que la dependencia entre tratamientos y porcentaje de parasitismo no fue significativa. A los 5 días el porcentaje total de larvas parasitadas fue 68.85% (n=122) ($\chi^2=10.87$; 11 g.l; P=0.05), mientras que a los 10 días alcanzó el 80% (n=125) ($\chi^2=8.6$; 11 g.l; P=0.12). En ambos casos sin embargo, SNI-7 presentó los mayores porcentajes de penetración (100%, n=23).

Esto permite destacar que a excepción de SNI-13 en todos los tratamientos, el porcentaje de parasitismo se incrementó con el tiempo, observándose, independientemente de la especie de nematodo empleada. Se presume que la acción de la respuesta inmune (ver sección 6.3) puede haber desintegrado los nematodos, generando una subestimación en el cálculo del porcentaje de penetración.

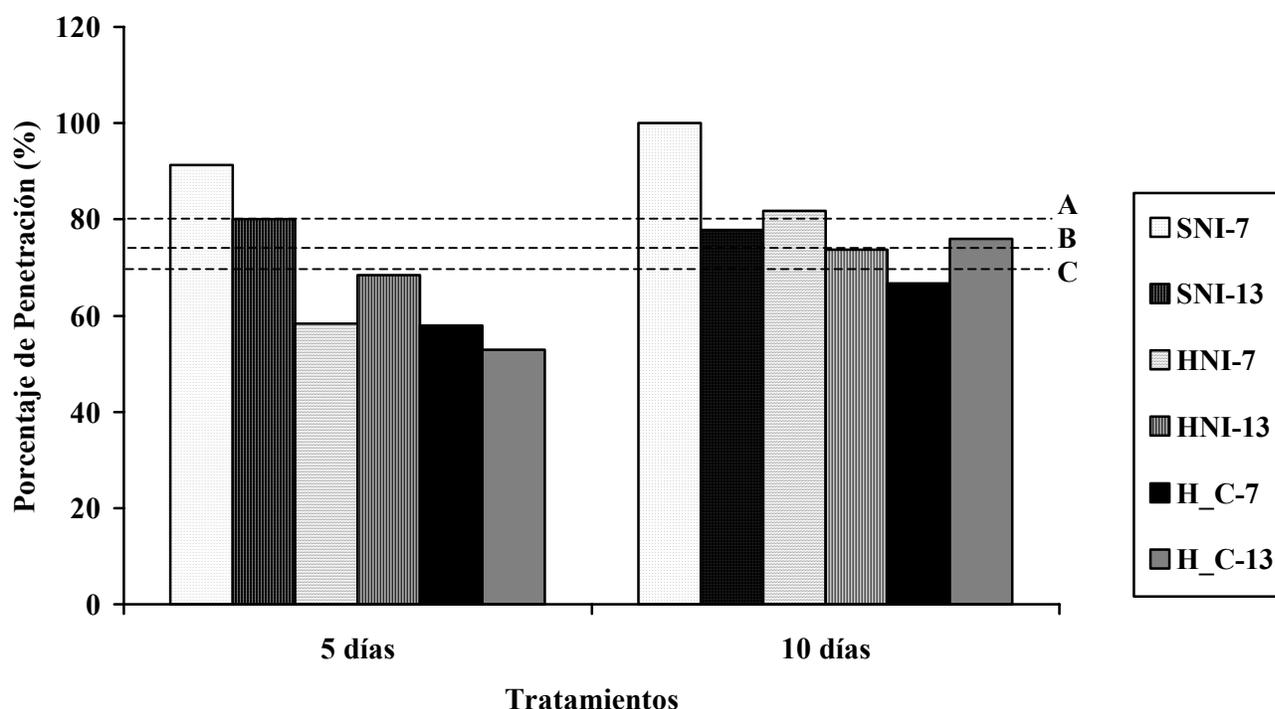


Figura 13. Comparación del porcentaje de penetración de larvas de tercer instar de *P. menetriesei* entre dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días), por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_C IAT) en dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml). **A**, es el porcentaje de penetración a los 10 días (80%); **B** porcentaje global (74.5%) y **C** porcentaje a los 5 días de evaluación (68.9%).

4.2.2 Porcentaje de Mortalidad

Globalmente, el porcentaje de mortalidad de las larvas fue bajo, 10.5% (n=247),

dependiendo significativamente de los tratamientos aplicados ($\chi^2=21.01$; 11 g.l; P=0.03).

Similares resultados, fueron obtenidos por Deseö *et al.* (1992) trabajando con *Melolontha melolontha*, una de las especies más dañinas en Europa, los autores, encontraron que las larvas de tercer instar no eran susceptibles a diferentes cepas de *Steinernema* y *Heterorhabditis*.

Noble & Noble (1971) proponen que la resistencia de los insectos debido a la edad, puede ser el resultado del mejoramiento de la resistencia natural. Los factores inmunológicos indudablemente juegan un papel importante en la susceptibilidad y en los estados iniciales juveniles la respuesta de los anticuerpos es más baja que en los más viejos. Debido a esto, al igual que Deseñ *et al.* (1992) se considera necesario el desarrollo de investigaciones sobre todos los estadios larvales del insecto plaga, *P. menetriasi*, antes de descartar una cepa o especie de nematodo entomopatógeno.

Los tratamientos con mayor porcentaje de mortalidad fueron en los que se evaluó *Heterorhabditis*, obteniéndose valores entre el 15 y el 30%. El tratamiento HNI-13-5 presentó el mayor valor 31.6% (n=19), seguido de H_C-7-5 y HNI-13-10 con 21% (n=19 para ambas cepas).

En contraste, los tratamientos con *Steinernema* presentan los valores más bajos de mortalidad, destacándose SNI-13-5 y SNI-7-10 con el 0% (n=20 y n=23) (**Figura 14**).

Nuestros resultados se semejan a los obtenidos en otros estudios a nivel de laboratorio, que comparan especies y cepas de ambos géneros de nematodos contra larvas de escarabajos, en los cuales, especies de *Heterorhabditis* se presentan como más agresivas, virulentas o patogénicas que especies de *Steinernema*.

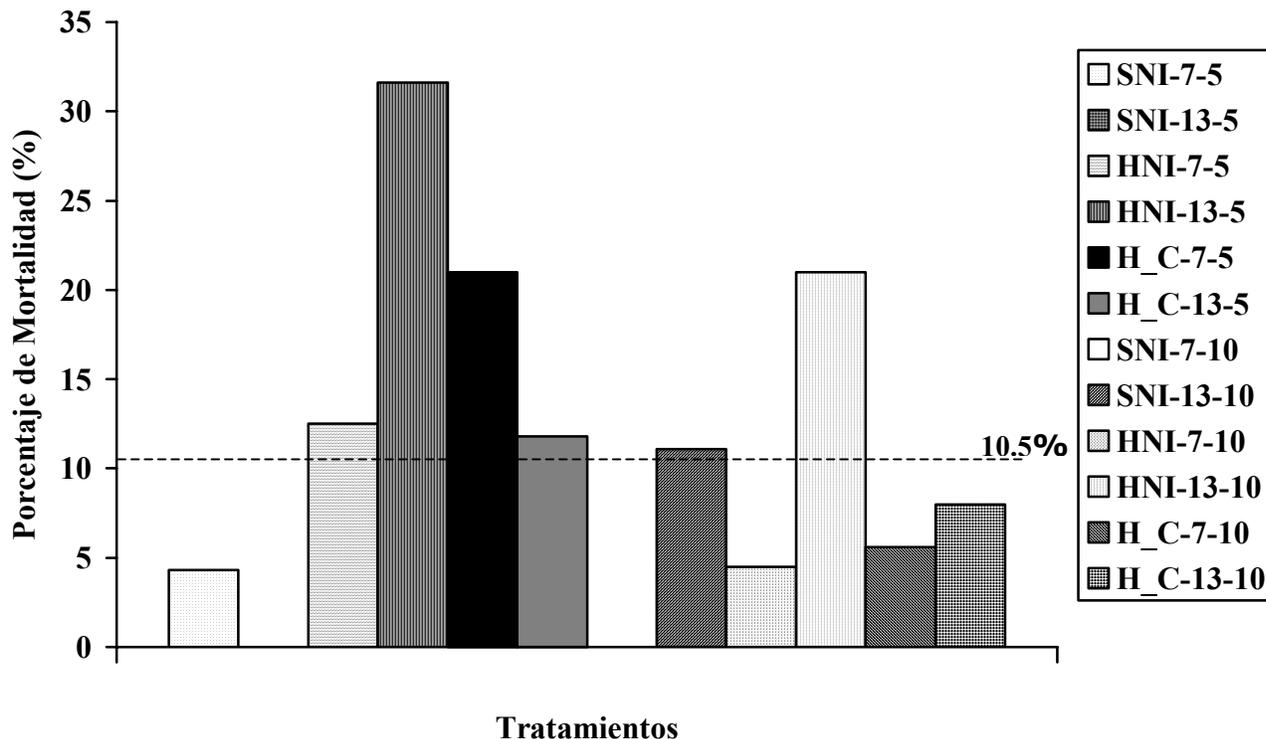


Figura 14. Porcentaje global de mortalidad de larvas de tercer instar de *P. menetriesi* por tres especies de nematodos nativos, dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml) y en dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días).

En efecto, Wright *et al.* (1988), encontraron que el porcentaje de mortalidad ocasionado por *H. heliothidis* (100%,n=19) sobre larvas de *P. japonica*, era significativamente mayor que el causado por *S. glaseri* y *S. feltie* (100%, n=13 y n=2). En forma similar, Villani & Wright, en ese mismo año, encontraron que *H. heliothidis* causó entre 30-50% más de mortalidad que *S. feltie* sobre larvas de *Rhizotrogus majalis* y Forschler & Gardner en 1992, encontraron que especies de *Steinernema* (*S. glaseri* y *S. carpocapsae*) requerían, respectivamente, 6.8 y 16.6 veces más de formas infectivas para producir el 50% de mortalidad (i.e. LC₅₀) en larvas de *P. hirticula*, que su contraparte *H. heliothidis*.

Asimismo, Smits (1992) al comparar diferentes especies de nematodos sobre larvas de tercer instar de *Phyllopertha horticola*, encontró que *Heterorhabditis*, cepa HE-87.3, causó el 98% de mortalidad, mientras que las *S. anomali*, *S. glaseri* y *S. feltie* causaban mortalidades inferiores al 60%.

Adicionalmente, otras comparaciones en laboratorio de dos cepas de *S. carpocapsae* (S20 y All) y *H. bacteriophora* cepa HP88, demostraron una vez más la mayor efectividad de los heterorhabditidos, al presentar una mortalidad dos veces mayor que steinernematidos, esta vez sobre larvas del escarabajo-plaga *Maladera matrida* (Gaugler *et al.* 1994).

Sorprendentemente, y contrario a lo registrado por otros autores (Converse & Grewal 1998, Villani & Wright 1988), quienes obtuvieron mayores valores de mortalidad a medida que pasaba el tiempo, el mayor porcentaje de larvas muertas fue a los 5 días de evaluación (13.11%, n=22) comparado con los 10 días (8%, n=125) (**Figura 15**). Una posible explicación para este fenómeno, recae sobre las variaciones, no controladas, de los especímenes de *P. menetriesi* que fueron traídos directamente de dos regiones diferentes y usados en los tratamientos aleatoriamente, sin tener en cuenta este factor como fuente de variación.

No obstante, ante la imposibilidad de obtener ejemplares de cría, se realizó una “cuarentena” mediante la cual, las larvas fueron individualizadas en vasos plásticos con tapa y suelo estéril. Estas larvas fueron monitoreadas durante 1-2 meses, para garantizar de esta manera que las empleadas en los tratamientos no presentaran ningún tipo de patógeno.

Por otra parte, las chisas tratadas solo con ADE (larvas control) no presentaron mortalidad, confirmándose el buen estado de salud de las larvas.

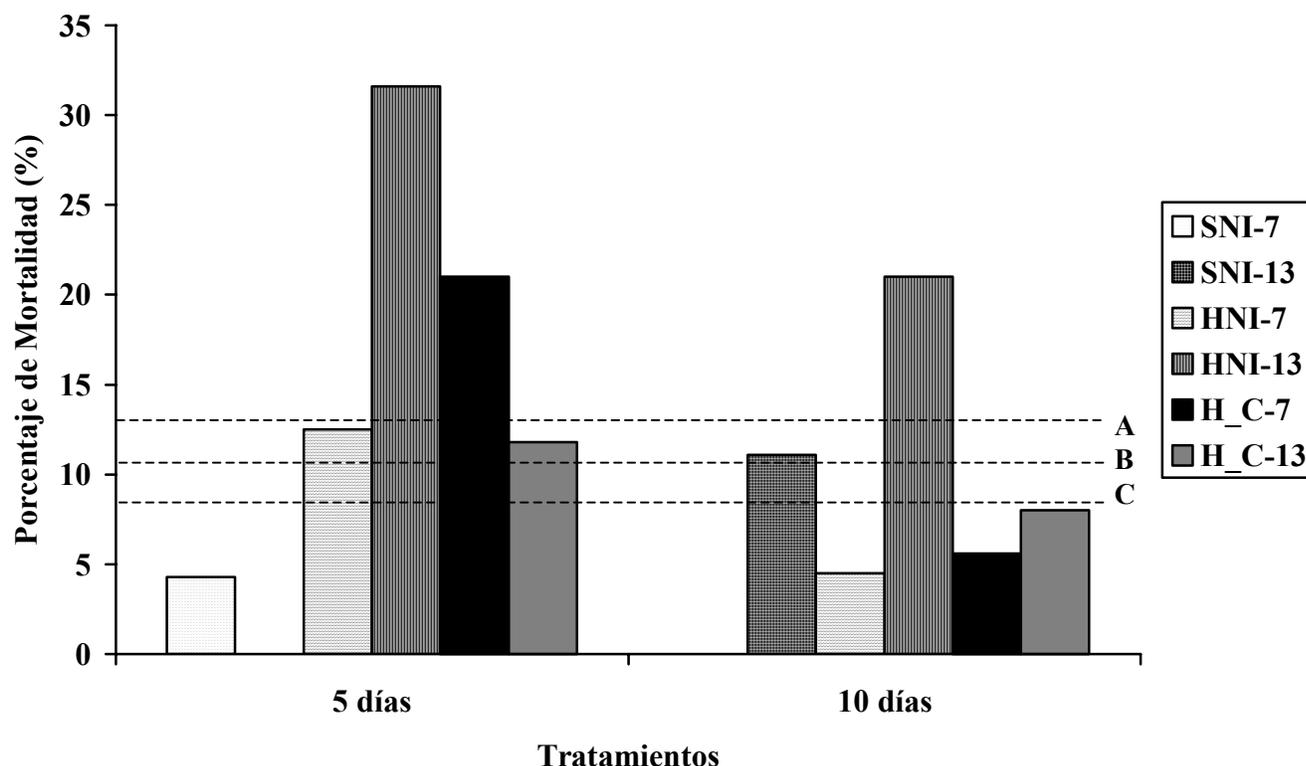


Figura 15. Comparación del porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *P. menetriesi* entre dos tiempos de evaluación diferentes (5 y 10 días), por tres especies de nematodos nativos (SNI, HNI, H_CIAT) en dos concentraciones distintas (7 000 y 13 000 IJs/ml). **A**, es el porcentaje de mortalidad a los 5 días (13.1%); **B** porcentaje global (10.5%) y **C** porcentaje a los 10 días (8%).

La variación en los resultados, debido a los diferentes orígenes de las larvas, es mencionado por Sikora (1990), citado por Sirjusingh *et al.* (1992), quien propone que la patogenicidad de una cepa de nematodo puede variar debido a la existencia de diferentes niveles de susceptibilidad o resistencia en las distintas poblaciones del insecto blanco. Adicionalmente según Villani *et al.* (1992), sugieren que esta susceptibilidad puede estar modificada por el estrés en el medio ambiente y su respuesta fisiológica ante este.

Por lo tanto, se ve necesario el empleo de insectos a partir de cría, para garantizar una respuesta homogénea y generalizable, controlando factores de variación como los anteriormente mencionados.

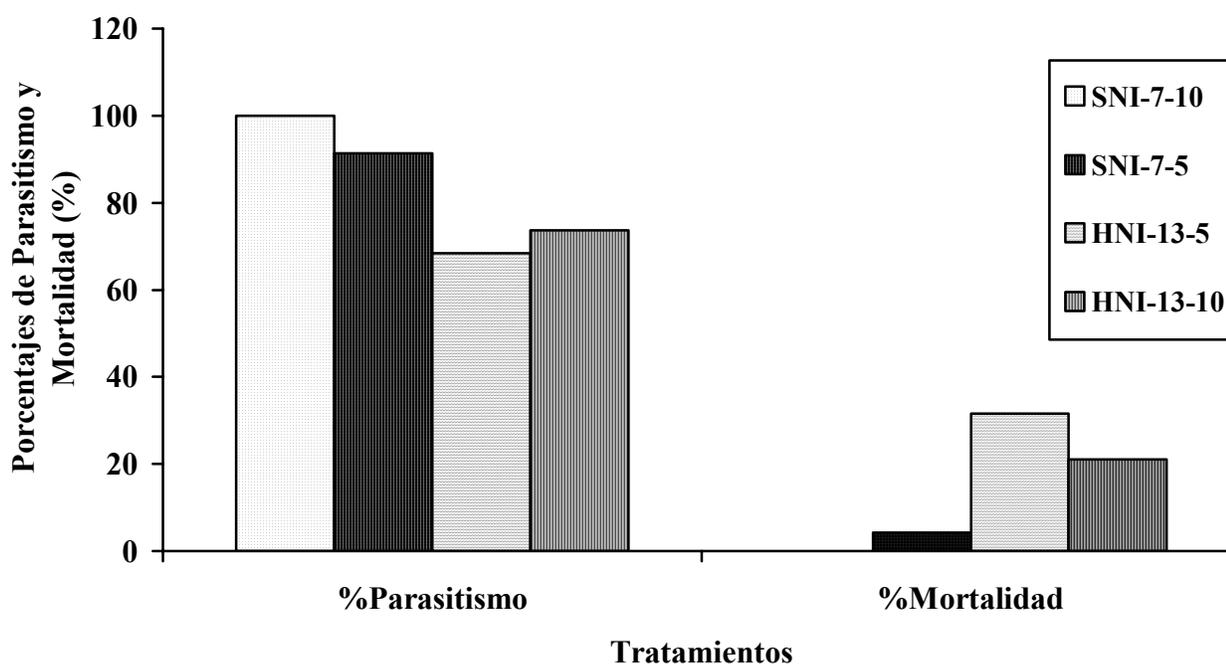


Figura 16. Porcentaje de parasitismo y mortalidad de los dos tratamientos de nematodos que más penetraron las larvas de *P. menetriesi* y las que causaron mayor mortalidad.

Al comparar gráficamente los porcentajes de parasitismo y mortalidad (**Figura 16**) de los tratamientos que presentaron mayor penetración (SNI-7-10 y SNI-7-5) y mayor mortalidad (HNI-13-5 y HNI-13-10), se observa que, los primeros ocasionaron mortalidades muy bajas 0% (n=23) y 4.35% (n=23), respectivamente. Esta aparente contradicción, fue observada por Selvan *et al.* (1993) quienes encontraron que aunque *S. glaseri* (cepa NJ-43) causó mayor mortalidad (83.3%) a las larvas de *P. japonica*, la cepa NC fue la de mayor porcentaje de penetración (62.3%) pero con menor mortalidad (40%).

Esto podría atribuirse a una mayor eficacia de los nematodos y para nuestro caso, como se mencionó anteriormente en el marco teórico, el mayor porcentaje de mortalidad con un número bajo de penetración, mostrado por las cepas de *Heterorhabditis* puede deberse a que gracias a su condición hermafrodita, solo un IJ es necesario para causarle la muerte al insecto hospedero e iniciar el ciclo de vida de los nematodos.

Esto se observó en las larvas muertas que fueron separadas en cajas petri, a partir de las cuales se obtuvieron infectivos juveniles vivos, veinte y hasta treinta días después de la infección, los cuales fueron recuperados en trampas “White” durante cerca de diez días, confirmándose la muerte de las chisas por causa de los nematodos entomopatógenos.

4.3 Portal de Entrada y Supervivencia de los Nematodos

El conteo aproximado de los nematodos vivos y muertos encontrados en las cinco secciones en que se disectó cada larva (**Tabla 9**), mostró que la tendencia de penetración es por la cabeza (140 chisas). La mayoría de los infectivos se alojaron en la porción anterior del intestino, o buche (**Figura 17**). Estos resultados coinciden con lo descrito por Ishibahis & Kondo (1990), Forschler & Gardner (1991) y Sirjusingh *et al.* (1992), quienes proponen que el principal portal de entrada de los nematodos a las larvas de escarabajos es por el tracto digestivo.

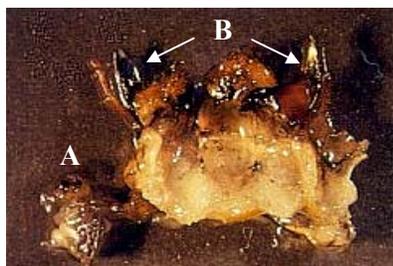


Figura 17. Discción cabeza de larva de *P. menetriesi*. **A**, gula; **B**, mandíbula.

No. de CHISAS	SEGMENTO					TOTAL
	CABEZA	TORAX	ABDOMEN ₁	ABDOMEN ₂	RASTER	
Con nematodos	140	31	25	43	59	298
Con nematodos muertos	58	18	14	27	47	34
Con nematodos vivos	122	17	16	22	25	202

Tabla 9. Número de chisas con nematodos en cada sección del cuerpo, se separan el número de chisas con nematodos vivos y muertos.

Cabe anotar que la cabeza presentó el mayor número de chisas con nematodos muertos (58) (**Tabla 9**) (**Figura 18**). Aunque no verificado en este estudio, es posible que la acción de los fluidos intestinales del hospedero, hayan matado los parásitos, tal como lo destaca Dowds & Peters (2002). Los autores identificaron este hecho como un limitante para el parasitismo de nematodos a través del tracto digestivo.



Figura 18. Nematodos muertos a partir de chisa disectada

Hasta el presente, no se ha identificado el tipo de respuesta inmune de *P. menetriasi*, ante la invasión de nematodos entomopatógenos y/o la bacteria simbiote que estos liberan. Los nematodos muertos encontrados en el presente trabajo, tenían en su interior partes blancas alternando con espacios transparentes (**Figura 19**) y al tomarlos con la aguja de disección,

se partían en trozos pequeños. Se puede suponer que la muerte fue ocasionada por respuestas de tipo humoral: reacciones con componentes no celulares, como encapsulación melánica y producción de péptidos antimicrobiales que, en ocasiones, causan la muerte de los nematodos sin ningún síntoma de ataque (Poinar 1979), la acción de los fluidos intestinales puede ser una de estas respuestas según lo descrito por Dowds & Arne (2002),



Figura 19. Fotografía microscópica de nematodos muertos

Vale la pena resaltar la necesidad de continuar la investigación en esta área para lograr identificar el tipo de biocontrolador más resistente al sistema inmune del *P. menetriasi* de acuerdo a su estado de desarrollo, para implementarlo en un programa efectivo de manejo integrado de plagas.

5. CONCLUSIONES

- Bajo condiciones controladas de laboratorio, las especies de nematodos *Steinernema* sp. SNI 0198, *Heterorhabditis* sp. HNI 0100 y *Heterorhabditis* sp. CIAT presentan grados variables de patogenicidad sobre larvas de tercer estadio de *Phyllophaga menetriesi*.
- Aunque el porcentaje global de penetración de las tres especies de nematodos nativos alcanzó el 74.5% (n=247) se presentaron variaciones estadísticamente significativas (P=0.014) entre tratamientos.
- El mayor porcentaje de penetración se dio en el tratamiento con *Steinernema* sp., alcanzando valores mayores o iguales al 80%, mientras que *Heterorhabditis* sp. CIAT, fue el de menor valor con 52.9% (n=17).
- Dado el alcance práctico de los resultados obtenidos es importante identificar, a nivel específico, los nematodos evaluados en este proyecto. Esto permitiría confirmar si la cepa de *Steinernema* corresponde a *S. feltie* o si es una nueva especie o cepa, que ocasiona altos porcentajes de penetración.
- El aumento en el porcentaje de penetración a través del tiempo, fue un fenómeno observado en este bioensayo, concordando con lo encontrado por otros autores, con otras especies de nematodos e insectos-plaga.

- El tamaño de la muestra impide establecer conclusiones firmes sobre la dependencia de los tratamientos y el porcentaje de parasitismo en el tiempo (5 y 10 días), por lo tanto, son necesarias nuevas evaluaciones con muestras poblacionales más grandes.
- En general el porcentaje de mortalidad fue bajo, 10.5% (n=247), con una dependencia significativa entre tratamientos y mortalidad (P=0.03).
- Los tratamientos con *Heterorhabditis* ocasionaron los mayores porcentajes de mortalidad, con valores de 31.6% (n=19) para HNI-13-5 y 21% (n=19) con HNI-13-10 y H_C-7-5, mientras que en los tratamientos con SNI-13-5 y SNI-7-10 de *Steinernema* se presentaron mortalidades nulas (n=20 y n=23, respectivamente).
- Los resultados obtenidos, corroboran los hallazgos reportados en la literatura científica en donde se establece que las especies de *Heterorhabditis* causan mayores mortalidades que los *Steinernema*.
- El origen geográfico diferente de las larvas empleadas en los bioensayos genera dificultades en el análisis de las variaciones en los porcentajes de mortalidad observados a los 5 días de evaluación, por lo tanto se requiere realizar nuevos ensayos pero empleando insectos obtenidos a partir de una cría de laboratorio.
- Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de penetración (*Steinernema* sp.), no fueron aquellos que causaron la mayor mortalidad (*Heterorhabditis* sp.), por lo tanto es plausible inferir una mayor eficacia de los últimos.

- El principal portal de entrada de los nematodos hacia la hemolinfa de la chisa es la boca, probablemente, los entomopatógenos logran entrar en el momento de la alimentación, transportados por el bolo alimenticio.

- Los nematodos fueron encontrados principalmente en la primera sección del intestino anterior, o buche, concordando con la información presentada ya por otros autores.

- En el desarrollo de futuras investigaciones en las que se busque encontrar un entomopatógeno efectivo para el control biológico de *Phyllophaga menetriesi*, es necesario hacer hincapié en tres puntos importantes a tener en cuenta: utilizar especímenes exclusivamente de cría, para minimizar los factores de variación como respuesta inmune, edad, calidad y salud de los insectos; evaluar diferentes cepas y especies de nematodos en todos los estados de desarrollo de la plaga y finalmente, desarrollar investigaciones en la inmunidad de las chisas, para identificar que tipo de respuesta es la que se presenta contra los nematodos y la bacteria simbiote.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, B. & K. NGUYEN. 2002. Taxonomy and systematics. Págs. 1-28 en: R. Gaugler. Entomopathogenic nematology. CAB International.

- AKHURST, R.J. & N.E. BOEMARE. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Págs. 75-90 en: R. Gaugler & H. Kaya (eds). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estado Unidos.

- AMAYA, L. M. & E. BUSTAMANTE. 1975. Control biológico de tres especies de coleópteros plagas del suelo en Colombia. Publicación Científica del Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 10(3):269-282.

- ANDREWS, K. L. 1984. El manejo integrado de plagas invertebradas en cultivos agronómicos, hortícolas y frutales. Proyecto de manejo integrado de plagas de Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 85p.

- BEDDING, R. A. 1990. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology into developing countries. Págs. 233-240 en: R. Gaugler & H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estado Unidos.

- BELLOTTI, A. C., C. CARDONA & L. RIIS. 1997. Burrowing bugs and whitegrubs, major pests of food crops in Colombia. Pág. 130-133 en: P. G. Allsopp, D. J. Rogerts & L. N. Robertson (eds.) Soil Invertebrates in 1997. Bureu of Sugar Experiment Stations. Brisbane, Australia.

- BOEMARE, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Págs. 35-56 en: R. Gaugler. Entomopathogenic nematology. CAB International.

- BOSQUE-PEREZ, N. 1992. Major insect pests of maize in Africa: biology and control. IITA Research Guide 30, Training program. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria. 28p.

- CAICEDO, A. M. & A. BELLOTI. 1994. Evaluación del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología* 20(4):241-246.

- CIAT ANNUAL REPORT, PEST AND DISEASE MANAGEMENT 1994-1995. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. 285p.

- CONVERSE, V. & P. S. GREWAL. 1998. Virulence of entomopathogenic nematodes to the western masked chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology* 91 (2):428-432.

- COTO, D., J. SAUNDERS, C. VARGAS & A. B. S. KING. 1995. Plagas invertebradas de cultivos tropicales con énfasis en América Central: un inventario. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, Area de Fitoprotección. Turrialba, Costa Rica. 200p.

- DESEÖ, K., G. LAZZARI & R. ZELGER. 1992. Scarab problems and microbial control in Italy. Págs. 247-251 en: T. A Jackson & T. R. Glare (eds.). *Use of pathogens in scarab pest management*, Intercept. Andover. Inglaterra.

- DOWDS, B. C. A. & A. PETERS. 2002. Virulence mechanisms. Pág. 79-78 en: R. Gaugler (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. CAB International.

- EHLERS R.-U., D. SULISTYANTO & J. MARINI. 1996. Control of scarabaeid larvae in golf course turf with the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *H. bacteriophora*. *Bulletin of the International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants*. 19:(9) 84-85. .

- EHLERS, R. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiological Biotechnology* 56:623-633.

- FORSCHLER, B. & W. GARDNER. 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera:Scarabaeidae) to three entomogenous nematodes. *Journal of Economic Entomology* 84(3):841-843.

- FUJIE A., Y. TAKATA, M. TACHIBANA & T. YOKOYAMA. 1996. Insecticidal activity of an entomopathogenic nematode, *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) against *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae under different soil moisture conditions. *Applied Entomology and Zoology*. 31:(3) 453-455.
- GARCÍA, A., M. A. MORON & A. MARIN. 2003. ESTUDIOS SOBRE COLEOPTEROS DEL SUELO EN AMERICA, VI MESA REDONDA SOBRE INSECTOS PLAGAS EDAFICOLAS. 22-24 de octubre de 2003. Guanajuato, México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 359p.
- GARZON, M. Y., B. O. AZA, J. JIMENEZ & J. E. LUQUE. 1996. Potencial del nematodo *Steinernema* sp. para el control biológico del gusano blanco de la papa. *Revista colombiana de entomología* 22(1):25-30.
- GAUGLER, R., I. GLAZER, J. CAMPBELL & N. LIRAN. 1994. Laboratory and field evaluation of an entomopathogenic nematode genetically selected for improved host-finding. *Journal of Invertebrate Pathology*. 63:68-73.
- GREWAL, P. S., S. K. GREWAL, V. S. MALIK & M. G. KLEIN. 2002. Differences in susceptibility of introduced and native white grubs species to entomopathogenic nematodes from various geographic localities. *Biological Control* 24:230-237.
- ISHIBASHI, N. & E. KONDO. 1990. Behavior of infective juveniles. Págs. 139-150 en: R. Gauler & H. Kaya (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Inc. Estados Unidos.
- KAYA, H. & R. GAUGLER. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38:181-206.
- KAYA, H. & KOPPENHÖFER. 1999. Biology and ecology of insecticidal nematodes en: OPTIMAL USE OF INSECTICIDAL NEMATODES IN PEST MANAGEMENT . 28-30 de agosto de 1999. Nueva Jersey, Universidad Rutgers. 101 p.
- KAYA, H. & S. P. STOCK. 1997. Techniques in Insect Nematology. Págs 281-324 en: L. Lacey (ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Biological techniques series. Academic Press, Wapato, Estados Unidos.

- KING, A. B. S., & J. L. SAUNDERS. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales en América Central. Overseas Development Administration. Londres, Inglaterra. 182p.
- KLEIN, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. Págs 195-214 en: R. Gaugler & H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- KOPPENHÖFER, A. M. & E. M. FUZY. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. Biological Control 28:47-59.
- LONDOÑO, M.E. 1998. La chiza o mojoyoy, un modelo de investigación entomológica en: MEMORIAS 4° SEMINARIO TÉCNICO REGIONAL. Volumen IV Número 4. Octubre de 1998. Bucaramanga, Santander. 82 p.
- LONDOÑO, M. E. & M. PEREZ. 1994. Reconocimiento de los enemigos naturales de la chiza o mojoyoy (Coleoptera: Scarabaeidae) en el oriente antioqueño. Revista Colombiana de Entomología 20(3):199-206.
- LONDOÑO, M. E. & A. M. RIOS. 1997. Efecto de diferentes agentes de control biológico sobre *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata* (Coleoptera:Melolonthidae). Págs 35-42 en: Aconteceres entomológicos, para comprender los insectos: estudiarlos. Medellín – Colombia, Grupo de Entomología Universidad Nacional de Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología.
- LOPEZ, Y. 2001. Parasitismo natural sobre el complejo chiza (Coleoptera: Melolonthidae) en los municipios de Caldon y Buenos Aires del departamento del Cauca. Tesis de pregrado. Cali-Colombia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 36p.
- MADRIGAL, A. 2003. Insectos forestales en Colombia: biología, hábitos, ecología y manejo. Editorial Marín Vieco Ltda. Colombia. 848p.
- MORON, M.A. 1994. Experiencias en América sobre control de Scarabaeidae fitófagos en: SIMPOSIO DE PLAGAS RIZOFAGAS. XXI CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. 27-29 de julio de 1994. Medellín. 177 p.
- NOBLE, E. R & G. A. NOBLE. 1971. Parasitology, the biology of animal parasites. Tercera Edición. Londres. Lea & Febiger. 617 p.

- PARDO, L. C. 1994. Escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia en: SIMPOSIO DE PLAGAS RIZOFAGAS. XXI CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA 27-29 de julio de 1994. Medellín. 159 p.

- PARDO, L. C. 2000. Avances en el estudio de chisas rizófagas (Coleoptera:Melolothidae) en Colombia, observaciones sobre los complejos regionales y nuevos patrones morfológicos de larvas en: XXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. 26-28 de julio de 2000. Medellín. 285 p.

- POSADA, F. 1993. Las chisas, sus enemigos naturales y recomendaciones sobre su manejo. Agricultura Tropical 30(3):71-79

- POINAR, G. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Inc. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos. 277p.

- POINAR, G. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Págs. 33-61 en: R. Gaugler & H. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

- POINAR, G. Jr. 1992. Nematodes associated with Scarabaeidae. Págs. 93-109 en: T. A Jackson & T. R. Glare (eds.). Use of pathogens in scarab pest management, Intercept. Andover. Inglaterra.

- RAMÍREZ, L. A. 2002. Efecto de varios entomopatógenos sobre *Phyllophaga menetriesi* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae), plaga de importancia económica para el departamento del Cauca. Tesis de pregrado. Medellín-Colombia, Universidad Nacional de Colombia.56p.

- RIOS-ROSILLO F. & S. ROMERO-PARRA. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo en el estado de Jalisco, México (Coleoptera). Folia Entomológica Mexicana 52:41-60.

- RITCHER, P.O. 1958. Biology of Scarabaeidae. Annual Review of Entomology 3:311-335.

- ROSALES, L. & Z. SUAREZ. 1998. Nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera:Curculionidae). Boletín de Entomología Venezolana. 13(2):123-140.

- SAENZ, A. 1999. Los nematodos entomopatógenos: una alternativa de control biológico. en: MEMORIAS XXVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. 28-30 de julio de 1999. Santafé de Bogotá.

- SAENZ, A. & J. E. LUQUE. 1999. Cuantificación invasiva de *Steinernema feltie* cepa Villapinzón en *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus* en: RESUMENES XXVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. 28-30 de julio de 1999. Santafé de Bogotá. 56p.

- SANCHEZ, G. & N. M. VASQUEZ. 1996. Manejo de plagas en el sistema de producción de arracacha en el departamento del Tolima. Ibagué, ICA. Boletín Técnico. 43p.

- SAS-STAT user's guide: version 6.4. Cary, N. C. SAS.Institute. 1994.

- SELVAN, S., R. GAUGLER & J. CAMPBELL. 1993. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against *Popillia japonica* (Coleoptera:Scarabaeidae) larvae. Journal of Economy Entomology 86(2):353-359.

- SELVAN, S., P. GREWAL, R. GAUGLER & M. TOMALAK. 1994. Evaluation of steinernematid nematodes against *Popillia japonica* (Coleoptera:Scarabaeidae) larvae: species, strains, and rinse after application. Journal of Economy Entomology 87(3):605-609.

- SHANNON, P. J. & M. CARBALLO. 1996. SEMINARIO-TALLER CENTROAMERICANO SOBRE LA BIOLOGIA Y CONTROL DE *Phyllophaga* spp. 23-27 de mayo de 1994, Turrialba, Costa Rica, CATIE. 132p.

- SIRJUSINGH, C., A. KERMARREC, H. MAULEON, C. LAVIS & J. ETIENNE. 1992. Biological control of weevils and whitegrubs on bananas and sugarcane in the Caribbean. Florida Entomologist 75(4):548-562.

- SMITS, P. 1992. Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis* in grass with Heterorhabditid nematodes. Págs. 229-235 en: T. A Jackson & T.

- R. Glare (eds.). Use of pathogens in scarab pest management, Intercept. Andover. Inglaterra.
- TANADA, Y. & H. KAYA. 1993. Insect pathology. California, Academic Press, Inc. Estados Unidos. 666p.
- TOWNSEND M. L., D. T. JOHNSON & D.C. STEINKRAUS. 1998. Laboratory studies of the interactions of environmental conditions on the susceptibility of green June beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs to entomopathogenic nematodes. Journal of Entomological Science. 33:(1) 40-48.
- VILLANI, A. G., S. KRUEGER & J. NYROP. 1992. A case study of the impact of the environment on insect/pathogen interactions: scarabs in turfgrass. Págs. 111-126 en: T. A Jackson & T. R. Glare (eds.). Use of pathogens in scarab pest management, Intercept. Andover. Inglaterra.
- VILLANI, M. G. & R. J. WRIGHT. 1988. Entomogenous nematodes as biological control agents of European chafer and Japanese beetle (Coleoptera:Scarabaeidae) larvae infesting turfgrass. Journal of Economic Entomology 81(2):484-487.
- WANG Y. & G. GAUGLER. 1999. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 72: 313-318.
- WOODRING, J. L. & H. K. KAYA. 1998. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas, Estados Unidos, Arkansas Agricultural Experiment Station. 19p.
- WRIGHT, R. J., M. G. VILLANI & F. AGUDELO-SILVA. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes for control of larval european chafers and japanese beetles (1):(Coleoptera: Scarabaeidae) in potted yew. Journal of Economic Entomology. 81(1):152-157.
- YEPES, F., L. C. PARDO, C. R. PEREZ & J. A. QUIROZ. 2000. Contribución al reconocimiento de especies de escarabajos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en el departamento del Antioquia en: XXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. 26-28 de julio de 2000. Medellín. 351 p.