

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Any Mercedes Lucero Mafla<sup>1</sup>,  
Luis Alberto Peña Villamil<sup>2</sup> y Leonel Cultid<sup>3</sup>

ABSTRACT

**The effect of *Steinernema sp.* entomonematode on *Ancognatha scarabaeoides* grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in laboratory and greenhouse conditions**

Organisms such as parasitic insect nematodes have played a fundamental role as biological control tools in integrated pest management programmes (IPM) during the last decade due to their broad world-wide distribution, selectivity and effectiveness in controlling insects. The present work was aimed at evaluating the effect of *Steinernema sp.* on *Ancognatha scarabaeoides* grubs in laboratory and greenhouse conditions. The nematode was obtained from infected *A. scarabaeoides* grubs found in the municipalities of Yacuanquer and Ospina (Nariño department, Colombia), an important potato growing area. An *A. scarabaeoides* larva was placed on damp filter paper in a 3 ml nematode suspension at different potato inoculation concentrations (1, 5, 15, 30, 50 and 100 nematodes/ml) for evaluating in vitro efficacy in the laboratory. There was 100% and 90% accumulated *A. scarabaeoides* grub mortality 18 days after inoculation with 100 and 150 nematodes/ml concentrations, respectively, at 87 nematodes/ml lethal concentration 90 (CL<sub>90</sub>). The *Steinernema sp.* entomonematode was evaluated at 50 (CL<sub>50</sub>) and 90 (CL<sub>90</sub>) lethal concentrations in greenhouse conditions, presenting 33.33% and 79.3% grub mortality, respectively, after 15 days of applying the treatments. This result indicates that this native bio-controller could be included in white grub integrated management in the Nariño department of Colombia.

**Key words:** *Steinernema sp.*, entomonematode, *Ancognatha scarabaeoides*, biological pest control, bio-controller.

Recibido: noviembre 25 de 2005.  
Aceptado: junio 24 de 2006.

1. Bacterióloga, Ms.C., Docente universitaria, Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Mariana, Pasto (Nariño). e-mail: alu2403@gmail.com

2. Investigador master asociado, I.A. Ms.C. Programa Agrícola. Estación Experimental Obonuco, CORPOICA, Pasto (Nariño). e-mail: lpena@corpoica.org.co

3. Ingeniero Agrónomo, Docente Colegio Mariscal Sucre. Fúnes (Nariño).

## Efecto de *Steinernema sp.* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae) en condiciones de laboratorio e invernadero

RESUMEN

En la última década, por su amplia distribución mundial, selectividad y efectividad en el control de insectos plaga, organismos como los nematodos que parasitan insectos (entomonematodos) han jugado un papel fundamental como herramientas del control biológico en programas de manejo integrado de plagas (MIP). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Steinernema sp.* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en laboratorio e invernadero. El nematodo se obtuvo de larvas infectadas por *A. scarabaeoides* encontradas en campo en los municipios de Yacuanquer y Ospina (Nariño, Colombia) una importante zona productora de papa. Para la evaluación de eficacia in vitro, se colocó una larva de *A. scarabaeoides* en una suspensión de 3 ml de nematodos a diversas concentraciones (1, 5, 15, 30, 50, 100 y 150 nematodos/ml). El porcentaje acumulado de mortalidad de las larvas de *A. scarabaeoides* 18 días después de la inoculación fue de 100% y 90% con las concentraciones de 150 y 100 nematodos/ml respectivamente y a una concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) de 87 nematodos/ml. En invernadero *Steinernema sp.* se evaluó a las concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>), presentando a los 15 días de aplicados los tratamientos porcentajes de mortalidad de larvas de 33,3% y 79,3%, respectivamente. Este resultado abre la posibilidad de incluir este biocontrolador nativo en el manejo integrado de chisas en el departamento de Nariño.

**Palabras clave:** *Steinernema sp.*, entomonematodo, *Ancognatha scarabaeoides*, control biológico de plagas, biocontroladores.

INTRODUCCIÓN

**A**NCOGNATHA SCARABAEOIDES (Coleoptera: Scarabaeidae) se considera una de las plagas más importantes de los cultivos de papa y trigo en Colombia, si se tiene en cuenta su amplia distribución en las zonas productoras de Nariño, Cundinamarca y Boyacá y el costo que su control implica; en efecto, las 'chisas' ocasionan pérdidas en las áreas cultivadas que oscilan entre 75% y 100% (Parada, 2001; Pumalpa, 1987; Yépez, 1994).

En la actualidad el control de las chisas se lleva a cabo por medio de la aplicación de diferentes insecticidas químicos como el clorpirifos (Lorsban®: 250 cm<sup>3</sup>·200 L<sup>-1</sup> de agua) del cual se realizan tres aplicaciones en el transcurso del ciclo vegetativo de la planta de papa (Panesso, 2006). También se realizan prácticas culturales como la recolección manual de larvas y el uso de trampas de luz, las cuales se colocan en los lotes infestados en las épocas de mayor precipitación; las trampas se ubican sobre una fosa donde previamente se ha colocado

tamo de trigo o residuos de cosecha y con la ayuda de una malla se cubre la fosa para evitar que los adultos de chisa vuelen. Posteriormente, la materia orgánica junto con los insectos capturados se aplican a los cultivos (Peña y Lucero, 2003).

Debido al incremento de la infestación por *Ancognatha scarabaeoides* la frecuencia en la aplicación de los insecticidas se ha intensificado, llegando incluso a cinco aplicaciones, lo cual ocasiona el aumento en los costos de producción hasta en un 30%, contaminación ambiental y en general un desequilibrio en el agroecosistema (Londoño y Pérez, 1994; Sañudo y Guzmán, 1995). En la búsqueda de alternativas para controlar la plaga, se plantea el uso del nematodo entomopatógeno *Steinernema sp.*, el cual ha mostrado buenos resultados en otras plagas tropicales (Garzón *et al.*, 1996). Este agente de control biológico habita y se reproduce, tanto en campos cultivados como en áreas boscosas naturales, lo cual demuestra que, simultáneamente con las cuidadosas prácticas de cultivo

realizadas en la producción de papa, las poblaciones de nematodos entomopatógenos se mantienen en el suelo e infectan insectos dañinos de importancia económica (Parada, 2001). *Steinernema sp.* puede utilizarse en forma inundativa como insecticida biológico o en aplicaciones inoculativas, ambas formas de aplicación pueden asegurar el establecimiento del nematodo y contribuyen a reducir así las poblaciones de la plaga (Kaya y Gaugler, 1993).

El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar bajo condiciones de laboratorio e invernadero, el control de larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, mediante el uso del entomonemátodo (EN) *Steinernema sp.*, como una alternativa eficaz y económica para el beneficio del sector productivo y el ecosistema en general.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación Obonuco, de CORPOICA, ubicado en el municipio de San Juan de Pasto, departamento de Nariño, a una altura de 2.710 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 13°C.

##### Obtención de *Steinernema sp.*

El entomonemátodo *Steinernema sp.* fue aislado de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* con síntomas de ataque de nematodos que se hallaron en campos de los municipios de Ospina y Yacuanquer (Nariño). En el laboratorio las larvas se colocaron en cámaras White con una solución de formaldehído al 0,3% (Bustillo, 1976); al cabo de 48 horas se recogieron los nematodos y se colocaron en cajas plásticas de 15 x 20 cm que contenían un sustrato estéril conformado por tierra, lombricompost y tamo de trigo descompuesto, agregando continuamente larvas de 'chisas' recolectadas en campo (Sañudo y Castillo, 1994). Posteriormente, se siguió la metodología empleada por España y Quiñónez (1996) y Garzón et al. (1996) que consiste en obtener una solución de 100 nematodos para colocar en cada caja de Petri; para ello se debe individualizar dicha población mediante el uso de una tapa siracusa de fondo dividido que facilita el conteo.

##### Inoculación de larvas de *A. scarabaeoides*

En el fondo de la caja de Petri se dispuso un papel filtro humedecido uniforme-

mente con la solución de nematodos, se colocó una larva de chisa y se le cubrió con otro papel filtro; las cajas se taparon y colocaron en total oscuridad tapándolas con tela negra.

Se realizaron observaciones periódicas hasta que se manifestaron los primeros síntomas del ataque de nematodos: pérdida de la actividad y oscurecimiento de la parte dorsal del metatórax. Las larvas muertas se sometieron a desinfestación durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril; enseguida las larvas se colocaron en embudos de Baerman con una solución de formaldehído al 0,5% y después de 48 horas se determinó la presencia de nematodos mediante observaciones con el estereoscopio; posteriormente se almacenaron en un recipiente de vidrio de color ámbar que contenía una solución de formaldehído al 0,3% y una gota de Tritón AC para lubricar las paredes del recipiente y evitar que los nematodos se adhieran a éstas. La suspensión de nematodos se mantuvo en agitación durante tres meses.

##### Pruebas de patogenicidad *in vitro* de *Steinernema sp.* sobre larvas de *A. scarabaeoides*

Para determinar las concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>) se realizó un bioensayo con un diseño completamente al azar con ocho tratamientos, cuatro repeticiones por tratamiento y cinco unidades experimentales por repetición, para un total de 20 unidades experimentales por tratamiento. Se evaluaron concentraciones de 1, 5, 15, 30, 50, 100 y 150 nematodos/ml y se siguió la metodología empleada por Garzón et al. (1996) que consistió en colocar papel filtro de 90 mm de diámetro en cajas de Petri que se esterilizan por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión. Posteriormente, el papel filtro se humedeció con 3 ml de la suspensión de nematodos a cada una de las concentraciones en evaluación. Después se colocó una larva de *Ancognatha scarabaeoides* y se cubrieron con otro papel filtro. A cada caja de Petri se le colocó su respectiva tapa, se marcaron y se taparon con una tela negra durante 18 días; cada tres días se registró la mortalidad de las larvas, después de lo cual

se lavaron y se colocaron en cámaras White.

Los porcentajes de mortalidad acumulada al día 18 se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza, pruebas de comparación múltiple de Duncan y por el método estadístico Probit se encontraron las concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>).

##### Pruebas de patogenicidad en invernadero de *Steinernema sp.* sobre larvas de *A. scarabaeoides*

Las pruebas de patogenicidad en invernadero se llevaron a cabo en materos con suelo estéril, cada uno con 15 larvas de *Ancognatha scarabaeoides* recolectadas en campo, y la aplicación líquida de las concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>) que contenían 38 nematodos/ml y 87 nematodos/ml, respectivamente.

Se montó un diseño completamente al azar, con dos tratamientos que correspondían a las concentraciones letales, tres repeticiones por tratamiento y cinco unidades experimentales por repetición, para un total de 15 unidades experimentales por tratamiento y un testigo.

La mortalidad de las larvas de *A. scarabaeoides* se determinó a los 5, 10 y 15 días de montada la prueba y los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de Duncan.

Las larvas que se encontraron muertas en el suelo se colocaron en trampas White con una solución de formaldehído al 0,3% y al cabo de 48 horas se recogieron los nematodos, siguiendo las recomendaciones de Bustillo (1976).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Pruebas de patogenicidad de *Steinernema sp.* sobre larvas de *A. scarabaeoides* en laboratorio

En el laboratorio la toma de datos de mortalidad se realizó cada 72 horas (3 días) durante 18 días, tiempo en el cual se alcanzó el 100% de mortalidad de las larvas con el tratamiento correspondiente a la concentración de 150 nematodos/ml.

Se observó que a mayor concentración de nematodos aplicada a las larvas

se incrementó el porcentaje de mortalidad obtenido. Este resultado concuerda con los trabajos realizados por Koppenhofer y Fuzy (2004) y Anzari et al. (2006) que demuestran que una elevada concentración de nematodos ocasiona una alta mortalidad de larvas de Coleoptera: Scarabaeidae.

Al someter a un análisis de varianza los datos de mortalidad acumulada obtenidos en cada uno de los tratamientos se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ( $P < 0,0001$ ). La aplicación de 150 nematodos/ml obtuvo el 100% de mortalidad hacia el día 18 (Tabla 1); con los tratamientos restantes se obtuvieron porcentajes de mortalidad inferiores: 90%, 65%, 40,25%, 5,75% y 0% con las concentraciones de 100, 50, 30, 15 y 5 nematodos/ml, respectivamente. Al aplicar la prueba de comparación múltiple de Duncan se encontró que las concentraciones de 1, 5, 15 nematodos/ml y el testigo no presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de mortalidad correspondientes al día 18 después de la inoculación de las larvas (Tabla 1). De igual manera sucedió cuando se compararon los porcentajes de mortalidad correspondiente a las concentraciones de 30 y 50 nematodos/ml, 50 y 100 nematodos/ml, y 100 y 150 nematodos/ml. En contraste, se presentaron diferencias significativas ( $P \geq 0,0001$ ) entre las concentraciones de 15 y 150 nematodos/ml. El testigo presentó una media de mortalidad del 5,75%.

Al analizar los resultados obtenidos por el método estadístico Probit, con grados de significancia de 0,95, se encontró que bajo condiciones de laboratorio *Steinernema* sp. parasitando larvas de *Ancognatha scarabaeoides* presentó una concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) de 38 nematodos/ml y una concentración letal 90 ( $CL_{90}$ ) de 87 nematodos/ml. Los límites de confianza para las concentraciones letales 50 ( $CL_{50}$ ) y 90 ( $CL_{90}$ ) se encuentran en la Tabla 2.

#### Pruebas de patogenicidad de *Steinernema* sp. sobre larvas de *A. scarabaeoides* en invernadero

En invernadero, la mortalidad acumulada de las larvas de *A. scarabaeoides* se evaluó estadísticamente a través de un análisis de varianza, encontrándose

**Tabla 1.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* por *Steinernema* sp. en las pruebas de patogenicidad en el laboratorio (lectura día 18,  $a = 0,0001$ ,  $cv = 44,0$ ).

Concentraciones	Medias (% mortalidad)
150	100 a*
100	90 ab
50	65 cb
30	40,25 c
15	5,75 d
Testigo	5,75 d
1	0 d
5	0 d

\*Medias seguidas con la misma letra no presentan diferencias significativas según las pruebas de comparación múltiple de Duncan ( $P = 0,0001$ ).

**Tabla 2.** Concentraciones letales medias 50 ( $CL_{50}$ ) y 90 ( $CL_{90}$ ) de *Steinernema* sp. en larvas de *Ancognatha scarabaeoides*.

Concentraciones letales (nematodos/ml)	Límite inferior (nematodos/ml)	Límite superior (nematodos/ml)
$CL_{50}$ : 38	20,8	62,5
$CL_{90}$ : 87	55,4	401,3

**Tabla 3.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en las pruebas de patogenicidad a nivel de invernadero (lectura día 15,  $a = 0,0001$ ,  $CV = 10,84$ ).

Concentraciones (nematodos/ml)	Medias (% mortalidad)
87	79,3 <sup>a*</sup>
38	33,3 <sup>b</sup>
Testigo	1,8 <sup>c</sup>

\*Medias seguidas con letra diferente presentan diferencias significativas, según las pruebas de comparación múltiple de Duncan ( $P = 0,0001$ ).

diferencias significativas entre las dos concentraciones evaluadas ( $P < 0,0001$ ).

De acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan, los promedios de mortalidad acumulada a los 15 días de aplicados los tratamientos se presentan en la Tabla 3. Se encontraron diferencias altamente significativas entre las dos concentraciones letales de nematodos y en el testigo que presentó un porcentaje de mortalidad del 1,8%. Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por Koppenhofer et al. (2004), que afirma que la virulencia del nematodo varía de acuerdo a la concentración empleada.

#### CONCLUSIONES

Se aisló el entomonemátodo *Steinernema* sp. de larvas nativas recolectadas en campos de Yacuanquer y Ospina (Nariño). En condiciones de laboratorio *Steinernema* sp. presentó un porcentaje de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* del 100% con la concentra-

ción de 150 nematodos/ml, a los 18 días de montada la prueba. *Steinernema* sp. en larvas de *A. scarabaeoides* presentó una concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de 38 nematodos/ml y una concentración letal 90 ( $CL_{90}$ ) de 87 nematodos/ml. A nivel de invernadero, se obtuvo un porcentaje de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* de 79,3% con la concentración de 87 nematodos/ml.

#### AGRADECIMIENTOS

Al ingeniero Luís Alfonso Muñoz por su apoyo en el procesamiento estadístico.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

Anzari, M.A., F. Ali y M. Moens. 2006. Compared virulence of the Belgian isolate of *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and the type population of *S. scarabaei* to white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Nematology* 8(5): 787-791.

- Bustillo, A.E. 1976. Patogenicidad del nematodo *Neoaplectana carpocapsae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxydia trychiata*. Rev. Colomb. Entomol. 2(4): 139-44.
- España, H.H., y M.A. Quiñónez. 1996. Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento in vitro del nemátodo *Neoaplectana* sp. patógeno de chisas (*Ancognatha* sp. – *Astaena* sp.). Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.
- Garzón, M.Y., B.O. Aza, J. Jiménez y J.E. Luque. 1996. Potencial del nematodo *Steinernema* sp. para el control biológico del Gusano blanco de la papa. Rev. Colomb. Entomol. 22(1): 25-30.
- Kaya, H.K. y R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38: 181-206.
- Koppenhofer, A.M. y E.M. Fuzy. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. J. Econ. Entomol. 97(6): 1842-1849.
- Koppenhofer, A.M., E.M. Fuzy, R.L. Crocker, W.D. Gelernter y S. Polavarapu. 2004. Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against 12 white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). Biocontrol Sci. Technol. 14(1): 87-92.
- Londoño, M.E. y M. Pérez. 1994. Reconocimiento de los enemigos naturales de la chisa o mojojey (Coleoptera: Scarabaeidae) en el oriente antioqueño. Rev. Colomb. Entomol. 20(3): 199-206.
- Panesso, H., M. Quijano y A. Londoño. 2006. Diccionario de especialidades agro-veterinarias. 34 ed. Editorial PLM. Santafé de Bogotá D.C. 1109 p.
- Parada, J.C. 2001. *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* en áreas de producción papera en Cundinamarca y sur de Boyacá. Agron. Colomb. XVIII: 3-13.
- Peña, L.A. y A.M. Lucero. 2003. Manejo integrado de chisas en el departamento de Nariño. Boletín divulgativo No.19. CORPOICA. San Juan de Pasto (Nariño). 16p.
- Pumalpa, N. 1987. Estudios biológicos y ecológicos de insectos plagas de trigo y cebada. Aspectos biológicos de las chisas. ICA. Informes de labores. Pasto, Colombia. pp. 188-197.
- Sañudo, B. y G.A. Castillo. 1994. Papel de los microorganismos en el control biológico de las plagas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. 200 p.
- Sañudo, B. y G. Guzmán. 1995. Experiencias en el manejo de chisas en Nariño. Labranza Cero 5(1): 1-7.
- Yépez, B. 1994. Aspectos biológicos y manejo de chisas. En: Curso de actualización técnica del cultivo del trigo. Ipiales (Nariño). pp. 189-206.