

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
YANAHUANCA**



**Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos en el
distrito de Yanahuanca-Daniel Carrión**

Para Optar el Título Profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Autor: Bach. Evilin Betsabe BASILIO AGUI

Asesor: Mg. Josuè Hernàn INGA ORTIZ

Cerro de Pasco - Perú-2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
YANAHUANCA**



TESIS

**Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos en el
distrito de Yanahuanca-Daniel Carrión**

Sustentada y aprobada ante los miembros del jurado:

**Ing. Manuel Jorge CASTILLO NOL
PRESIDENTE**

**Ing. Fernando James ÁLVAREZ RODRÍGUEZ
MIEMBRO**

**Mg. Fidel DE LA ROSA AQUINO
MIEMBRO**

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico a mi madre, hermanos quienes me apoyaron moral y económicamente para poder estudiar esta carrera y al mismo tiempo lo dedico a mis docentes de la Escuela de Agronomía con sede en Yanahuanca quienes me apoyaron con sus conocimientos para terminar con mi profesión.

RECONOCIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Mg. Sc. Josué Hernán Inga Ortiz por su asesoramiento en la presente tesis, así como también al Ms. Jesús Guillermo Alcázar Sedano del Centro Internacional de la Papa Lima.

También agradecer de manera especial a los miembros del jurado de tesis: Ing. Manuel Castillo Nole, Mg. Fidel de la Rosa Aquino, al Mg. Fernando Alvarez Rodríguez y al Ing. Alfredo Córdor Perez, por las sugerencias y la revisión de la tesis.

Es propicia la oportunidad de agradecer a la plana docente de la escuela de Agronomía de la UNDAC sede Yanahuanca por brindarme los conocimientos y sus experiencias que han servido de mucho en mi formación y la culminación de la carrera.

No quiero olvidar de agradecer a mis colegas y al personal administrativo de mi alma mater.

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el distrito de Yanahuanca, provincia de Daniel Alcides Carrión del departamento de Pasco y en el laboratorio de entomología de la UNDAC Sede Yanahuanca. El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de nematodos entomopatógenos en el distrito de Yanahuanca-Pasco. Alrededor de 40 muestras de suelo fueron obtenidas de 8 puntos de muestreo a diferentes altitudes, tipos de suelo, tipo de cultivos dentro de dicho distrito. Los puntos fueron georeferenciados con el GPS. Los nematodos entomopatógenos fueron aislados al incorporar al suelo como insectos trampa larvas de *Galleria mellonella* L. Para la identificación del género del nematodo fue en Centro Internacional de la Papa CIP. El diseño empleado fue descriptivo (Frecuencias en porcentajes y medias). Los resultados obtenidos fueron: De un total de 40 muestras recolectadas en el distrito de Yanahuanca, al ser evaluadas en el laboratorio del CIP se identificó solamente al género *Heterorhabditis*. De las muestras de suelo obtenidas a distintas altitudes en el distrito de Yanahuanca en sistemas agrícolas, pastizales y vegetación natural, entre los 2979 a 3658 msnm, se identificó al género *Heterorhabditis*. La presencia de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* se encontraron en suelos Franco arcillo arenoso, franco arenoso y franco arcilloso, con contenido de materia orgánica entre 2.1 y 5.2 % y pH entre 7.09 y 8.25 De acuerdo con la sintomatología en larvas de *G. mellonella*, los 7 aislamientos obtenidos de las muestras pertenecen al género *Heterorhabditis*

Palabras clave: *Galleria mellonella* L. entomopatógeno, *Heterorhabditis*

SUMMARY

The present investigation was carried out in the district of Yanahuanca, province of Daniel Alcides Carrión of the department of Pasco and in the entomology laboratory of the UNDAC Yanahuanca Headquarters. The objective of this investigation was to detect the presence of entomopathogenic nematodes in the district of Yanahuanca-Pasco. About 40 soil samples were obtained from 8 sampling points at different altitudes, types of soil, type of crops within said district. The points were georeferenced with the GPS. The entomopathogenic nematodes were isolated by incorporating larval traps of *Galleria mellonella* L. into the soil as insects. For the identification of the nematode genus it was in the CIP International Potato Center. The design used was descriptive (Frequencies in percentages and means). The results obtained were: Out of a total of 40 samples collected in the district of Yanahuanca, when they were evaluated in the CIP laboratory, only the genus *Heterorhabditis* was identified. From the samples of soil obtained at different altitudes in the district of Yanahuanca in agricultural systems, pastures and natural vegetation, between 2979 and 3658 meters above sea level, the genus *Heterorhabditis* was identified. The presence of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* was found in soils of sandy clay loam, sandy loam and loamy clay, with organic matter content between 2.1 and 5.2 % and pH between 7.09 and 8.25 According to the symptoms in larvae of *G. mellonella*, the 7 isolates obtained from the samples belong to the genus *Heterorhabditis*

Keywords: *Galleria mellonella* L. entomopatógeno, *Heterorhabditis*

INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por el uso indiscriminado de insecticidas químicos inorgánicos, orgánicos o de síntesis en la lucha contra insectos de interés agrícola, forestal o veterinario, debido principalmente a la aparición de razas de insectos resistentes, la acumulación de residuos tóxicos y en general la degradación del medio ambiente, los cuales además tienen efectos adversos sobre los insectos benéficos, ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos para el control de estos insectos.

Durante la última década, han tenido un elevado interés tanto por las universidades, los gobiernos y los científicos industriales sobre el control biológico alternativo de insectos por el uso de nematodos entomopatógenos ya que estos reúnen muchos criterios de selección, los cuales pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Kaya y Gaugler, 1993). En este contexto la utilización de los nematodos entomopatógenos como método de lucha biológica para el control de insectos plagas. Estos nematodos presentan una combinación de características intermedias entre los depredadores y parásitos, y los patógenos de insectos. Por una parte poseen la capacidad de actuar como agentes efectivos contra insectos plagas por su característica de acción como acechadores, emboscadores y navegadores quienes son atraídos al insecto hospedero (Lewis et al., 1993), pero además se pueden producir de forma masiva, almacenar y aplicar de forma semejante a los demás patógenos microbianos de insectos, el amplio rango de huéspedes y la seguridad para los mamíferos y en general para el resto de la fauna y flora, han suscitado un extraordinario interés por este método de control biológico. Este interés ha impulsado a varias empresas

a desarrollar los nematodos Steinernematidos y Heterorhabditidos como insecticidas biológicos, y a su vez, esta disponibilidad comercial de los nematodos entomopatógenos ha creado inmensas oportunidades para ensayar su eficacia contra una amplia variedad de insectos que puede constituir plagas.

Los nematodos Steinernematidos y Heterorhabditidos están asociados simbióticamente con las bacterias patógenas de insectos de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente (Akhurst y Dunphy, 1993). La forma infectiva de estos nematodos es en la fase juvenil que se encuentra en el suelo donde puede sobrevivir varios meses sin alimentarse y llevar una sola especie de bacteria, como simbionte, dentro del intestino (Akhurst, 1990).

Los nematodos se han aplicado exitosamente en el control de insectos plaga en cultivos agrícolas, hortícolas, forestales y zonas urbanas, en muchos países (Georgis, 1992). Sin embargo, en el resto de Centro América y Latinoamérica, no se han explotado completamente, más aún existe poca difusión de estos agentes de control biológico. Tal vez una de las razones es la carencia de información acerca de su potencial, identificación y distribución de nematodos nativos, lo cual podría permitir la selección de aislados o especies eficaces (Stock, 1995).

Existen numerosos trabajos sobre la eficacia de estos nematodos contra diversas plagas, cuyos resultados están recogidos en Poinar (1986), Begley (1990), Klein (1990), Georgis y Hague (1991). Todos los trabajos coinciden que las mayores eficacias se consiguen con insectos que se encuentran en hábitats crípticos y en el suelo, mientras que en aplicaciones foliares y en otros hábitats extremos se reduce mucho su eficacia.

Durante los últimos años, el número de aislados reportados se ha incrementado enormemente, siendo estos obtenidos de diferentes tipos de suelos donde habitan los insectos en diferentes países los cuales pertenecen a las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae (Poinar, 1990).

Tanto para los diversos estudios de los nematodos entomopatógenos así como el presente, se utilizó a *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae) conocido como la polilla de las colmenas o cera, es el insecto cebo más utilizado en el aislamiento, identificación y caracterización ecológica de los nematodos entomopatógenos.

Por esta razón es importante conocer la distribución natural de los nematodos entomopatógenos nativos del distrito de Yanahuanca, los cuales pueden tener diferente ocurrencia. Ya que es un requisito importante para poder conocer las especies de nematodos entomopatógenos nativos con la que contamos. De lo anterior se hace necesario impulsar el control microbiano en el país, además en el futuro contar con un inventario de los microorganismos nativos en diferentes áreas ecológicas en el Perú, con la finalidad de documentarlas, evaluar su potencialidad de uso en las diferentes plagas que afectan la producción agropecuaria, para así ofrecer una alternativa ecológica y sustentable de control de plagas. Por tal motivo es importante realizar este trabajo, dará pie a realizar futuras investigaciones no solo con el material aislado presente en el distrito de Yanahuanca sino usar la metodología presentado en el presente trabajo de investigación para posteriores trabajos de aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos en los diferentes departamentos del Perú.

ÍNDICE

Pág.

DEDICATORIA	3
RECONOCIMIENTO	4
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
INDICE	10
CAPÍTULO I PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	15
1.1 Identificación y determinación del problema.....	15
1.2 Delimitación de la investigación.....	15
1.3 Formulación del problema.....	16
1.3.1 Problema general.....	16
1.3.2 Problema específicos.....	16
1.4 Formulación de objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
1.5 Justificación de la investigación.....	17
1.6 Limitaciones de la investigación.....	18
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	19
2.1 Antecedentes de estudio.....	19
2.2 Bases teóricas – científicas.....	20
2.2.1 Aspectos generales sobre nematodos entomopatógenos.....	20
2.2.2 Nematodos entomopatógenos como potenciales controladores biológicos..	22
2.2.3 Los nematodos entomopatógenos Steinernatidae y Heterorhabditidae.....	23
2.2.4 Rango de hospederos.....	25
2.2.5 Ubicación taxonómica de Heterorhabditis sp.....	27
2.2.6 Características morfológicas del género Heterorhabditis.....	27
2.2.7 Relación nematodo, bacteria y hospedante.....	30
2.2.8 Relación nematodo - bacterias mutualistas.....	31
2.2.9 Comportamiento del nematodo entomopatógeno.....	33

2.2.10 Factores abióticos que influyen en los nematodos entomopatógenos.....	35
2.2.10.1 Condiciones edafológicas.....	35
2.2.11 Factores bióticos que influyen en los nematodos entomopatógenos.....	39
2.3 Definición de términos básicos.....	41
2.4 Formulación de hipótesis.....	42
2.4.1 Hipótesis general.....	42
2.4.2 Hipótesis específica.....	42
2.5 Identificación de variables.....	42
2.6 Definición operacional de variables e indicadores.....	42
CAPÍTULO III METODOLOGÍA Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN.....	43
3.1 Tipo de investigación.....	43
3.2 Métodos de investigación.....	43
3.3 Diseño de la investigación.....	43
3.4 Población y muestra.....	43
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	44
3.6 Técnicas de procesamientos y análisis de datos.....	44
3.7 Tratamiento estadístico.....	44
3.8 Selección, validación y confiabilidad de los instrumentos de investigación..	44
3.9 Orientación ética.....	44
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1 Descripción del trabajo de campo	46
4.1.1 Lugar de ejecución.....	46
4.1.2 Descripción del sistema agroecológico del distrito de Yanahuanca.....	46
4.1.3 Material de laboratorio.....	48
4.1.4 Muestreo de campo.....	49
4.1.5 Laboratorio.....	54
4.2 Presentación, análisis e interpretación de resultados.....	64
4.2.1 Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos.....	64
4.2.2 Presencia de nematodos entomopatógenos a diferentes altitudes y en diferentes cultivos.....	66
4.2.3 Nematodos entomopatógenos encontrados en diferentes tipos de suelos en el distrito de Yanahuanca.....	69

4.3 Prueba de hipótesis.....	72
4.4 Discusión de los resultados.....	72
4.4.1 Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos.....	72
4.4.2 Presencia de nematodos entomopatógenos a diferentes altitudes y en diferentes cultivos.....	72
4.4.3 Nematodos entomopatógenos encontrados en diferentes tipos de suelos en el distrito de Yanahuanca.....	73
CONCLUSIONES	
RECOMENDACIONES	
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PÁG.
Cuadro 1.	Datos de cada uno de los 8 puntos de muestreo, número de muestra, altitud, latitud, longitud, nombre del lugar de muestreo, características.....	52
Cuadro 2.	Lugares de muestreo, muestreos positivos y porcentaje de muestras positivas en el distrito de Yanahuanca.....	65
Cuadro 3.	Datos meteorológicos de los meses en que se realizó la colecta de la muestra de suelos.....	67
Cuadro 4.	Nematodos entomopatógenos registrados en función de cultivos y descanso (campo en barbecho).....	68
Cuadro 5.	Nematodo entomopatógeno registrado en función del pH del suelo....	69
Cuadro 6.	Nematodos entomopatógenos registrados en función de la materia orgánica.....	70
Cuadro 7	Nematodos entomopatógenos registrados en función a la clase textural del suelo.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁG.
Fig.1.	Lugares muestreados y colectas de suelo en el distrito de Yanahuanca.....	46
Fig.2.	Recolección de muestras en el distrito de Yanahuanca.	50
Fig.3.	Frasco con larvas de Galleria mellonella.....	54
Fig.4.	Larvas de Galleria mellonella infectadas por entomopatógenos.	55
Fig.5.	Aislamiento de nematodo entomopatógeno y características de la larva de Galleria mellonella infectada	56
Fig.6.	Uso de trampas White.....	59
	¡Error! Marcador no definido.	
Fig.7.	Almacenamiento de Heterorhabditis.	61
Fig.8.	Nematodo entomopatógeno Heterorhabditis en solución en placa Petri...	63
Fig.9.	Mantenimiento de nematodo entomopatógeno Heterorhabditis.....	64
Fig.10.	Porcentaje de muestras positivas según localidad de muestreo en el distrito de Yanahuanca.	66
Fig.11.	Porcentaje de Heterorhabditis en función a la altitud en el distrito de Yanahuanca.	67
Fig.12.	Porcentaje de muestras positivas con Heterorhabditis en función de cultivos y descanso (campo en barbecho).....	69
Fig.13.	Muestras positivas en función de la clase textural del suelo.....	71

CAPITULO I

PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación y determinación del problema

En la provincia Daniel Alcides Carrión los cultivos que son desarrollados por los agricultores manifiestas que son afectados su rendimiento por nematodos que atacan su sistema radicular. Con el fin de controlar estas plagas insectiles utilizan en forma indiscriminada los insecticidas causando problemas muy serios como afectando la muerte de la fauna benefica insectil, provocando resistencia de los insectos plagas y contaminando el medio ambiente.

Dentro de la fauna benefica existen insectos que pueden dar el equilibrio biologico y minimizar daños ocasionados por insectos, sin embargo es de interes tener conocimiento de sus presencia para saber en que dimensión estan presentes, para su identificación y posterior evaluación de su acción benefica, con el afan de que los agricultores consideren otras alternativas de control ante estos insectos plagas y puedan incluirlo en su manejo agronomico.

1.2 Delimitación de la investigación

El trabajo de investigación en la fase de campo se realizó la colección de muestras de suelo durante los meses de agosto y setiembre del 2014, tomando en cuenta los lugares perturbados y no perturbados por el hombre, ubicadas a diferentes altitudes en el Distrito de Yanahuanca, Provincia Daniel Alcides

Carrión, Departamento de Pasco y la fase de Laboratorio se ejecutó en la Escuela de Agronomía Filial Yanahuanca.

1.3 Formulación del problema

1.3.1 Problema general

- a) ¿Cuáles son los nematodos que causan bajos rendimientos de los cultivos en la provincia Daniel Alcides Carrión?

1.3.2 Problema específicos

- a) ¿Qué impacto ocasionará al identificar los generos de nematodos que predominan a diferentes altitudes, tipo de suelo y cultivos en el distrito de Yanahuanca?

1.4 Formulación de objetivos

1.4.1 Objetivo general

Detectar la presencia de nematodos entomopatógenos en el distrito de Yanahuanca-Pasco

1.4.2 Objetivos específicos

- a) Aislar e identificar nematodos entomopatógenos en el distrito de Yanahuanca.
- b) Identificar nematodos entomopatógenos mediante el muestreo sistematizado a diferentes altitudes y en diferentes cultivos en el distrito de Yanahuanca.
- c) Registrar en qué tipo de suelos se encuentran los nematodos entomopatógenos en el distrito de Yanahuanca.
- d) Clasificar los géneros de nematodos entomopatógenos existentes en el distrito de Yanahuanca.

1.5 Justificación de la investigación

Entre las razones que justifican este extraordinario interés, destacan la amplia distribución geográfica, el alto grado de adaptabilidad, su variabilidad genética y diversidad ecológica. Por lo cual, diversas especies están siendo utilizadas en el control biológico clásico, en programas de liberaciones inundativas o inoculativas y en el manejo integrado de plagas, contra una variedad de insectos. Por otro lado, la necesidad de encontrar e implementar nuevas estrategias de control alternativas para los insecticidas convencionales, diversas compañías comerciales han desarrollado y obtenido nuevos productos basados en nematodos entomopatógenos, lo que viene a confirmar la importancia de su uso como bioinsecticidas.

Los nematodos entomopatógenos son únicos porque poseen todos los atributos de un agente de control biológico “ideal”, debido al amplio rango de hospederos que presentan, capacidad de búsqueda, desarrollo e introducción de sus bacterias simbióticas dentro del cuerpo de los hospederos; al matar a los insectos dentro de las 24-48 horas siguientes para su desarrollo y reproducción; facilidad relativa de reproducción de los estadios infectivos a gran escala en medios artificiales, sólidos o líquidos, los cuales pueden ser almacenados por largos períodos y mantener su viabilidad y patogenicidad.

Los agricultores del distrito de Yanahuanca a través de la identificación de la presencia de nematodos beneficiosos o entomopatógenos podrán tener en cuenta

como una estrategia de control ante insectos plagas de suelos que atacan las raíces.

1.6 Limitaciones de la investigación

Disponer de claves para identificar las especies de nematodos, razón que fueron enviadas a la ciudad de Lima para su respectiva identificación con personal capacitado del Centro Internacional de la Papa.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

Poinar y Hom (1986) seleccionaron un lote de terreno de 3m de ancho por 15m de largo para probar si un millón de *Neoplectana carpocapsae* Weiser (*Steinernema carpocapsae*) por metro lineal permanecían viables o no a condiciones de campo, en cada surco se agregó semillas de maíz como indicador, tras el muestreo del terreno se pudo concluir que los NEPs pueden permanecer viables hasta por siete semanas después de la aplicación

Perrera (2009) comparo la efectividad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* y el insecticida Carbofuran 48 SC para el control de larvas de *Phyllophaga spp* gallina ciega, el porcentaje de mortalidad en invernadero fue de 97% para la dosis de 4 x 10⁸ Jls/ha, 67% para 2 x 10⁸ Jls/ha y 60% para Carbofuran (4 L/ha) y el porcentaje de 10 mortalidad obtenido en campo a través de riego por goteo con la dosis 2 x 10⁸ Jls/ha fue de 81% y 86% con Clorpirifos (Lorsban).

Naranjo et al. (2011) evaluaron la patogenicidad de *Steinernema sp*; y *Heterorhabditis sp*. Sobre ninfas y adultos de *Collaria scenica* y se determinó el efecto de diferentes concentraciones de Juveniles infectivos (Jis), el mejor resultado fue de 5000IJ la mayor patogenicidad fue para *Steinernema sp*. con mortalidad de 75 % en las ninfas a las 24 horas y 100 % a las 48 horas y los

chinchas tratadas con *Heterorhabditis* sp. Ofrecieron un 82 % a Cuarenta y ocho horas después de la inoculación.

Sánchez et al. (2012) Utiliza el nematodo *Heterorhabditis* indica en el manejo de *Phyllophaga* spp (gallina ciega) los ensayos se realizaron con larvas del tercer estadio y adultos recolectadas en cultivos de maíz, se aplicó una dosis de 2,500 nematodos·ml⁻¹ • la mayor mortalidad registrada en larvas fue después de cinco días de incubación con 46 % y 40 % para los tratamientos suelo y composta, los adultos fueron más susceptibles al nematodo H indica con un 99 %

2.2 Bases teóricas – científicas

2.2.1 Aspectos generales sobre nematodos entomopatógenos

Existen más de 3000 asociaciones simbióticas entre insectos y nematodos, 8 órdenes de los cuales comprenden la mayoría de los nematodos capaces de parasitar insectos sanos (Poinar, 1979). En la actualidad el parasitismo de los nematodos para los insectos es reconocido, de los cuales más de 30 familias están asociadas en alguna vía y de éstas, 9 muestran potencial para control biológico (Kaya, 1993). En orden ascendente aproximado las siguientes familias son Allantonematidae, Parasytlenchidae, Lotonchiidae, Tetradonematidae, Sphaerulariidae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae. (Kaya et al., 1993). Esto ha dado origen a los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema*, *Neosteinernema* y *Heterorhabditis*, a partir de Rhabditoides microbios tróficos y bacteriófagos (Poinar, 1990). Estos nematodos que infectan centenares de especies de insectos, de casi todos los Órdenes ocasionan esterilidad, reducción en la fecundidad,

longevidad y actividad del vuelo, retardan el desarrollo y cambios de comportamiento, morfológicos o fisiológicos (Kaya *et al.*, 1993).

Los tres géneros de nematodos mencionados son interesantes porque dependen de bacterias como fuente alimenticia y han desarrollado mecanismos para transportar e introducir bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* en insectos. Estas bacterias son capaces de matar a los insectos en 48 horas convirtiendo los cadáveres en un hábitat conveniente para su crecimiento y reproducción (Akhurst, 1982).

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). Los nematodos entomopatógenos son principalmente parásitos obligados y facultativos, pueden atacar a los estadios biológicos de larva, pre-pupa, pupa y adulto de insectos (Kaya y Hara, 1981).

Los nematodos de las familias Steinernmatidae y Heterorhabditidae, poseen los atributos de un agente de control biológico “ideal” (Timper *et al.*, 1988; Kaya y Gaugler, 1993; Kaya, 1993), considerando su seguridad a invertebrados, plantas y otros organismos no plaga (Akhurst, 1990; Poinar 1989). Por sus características, tienen una distribución geográfica amplia y un rango de hospederos (Poinar, 1990; Zimmerman, 1978).

2.2.2 Nematodos entomopatógenos como potenciales controladores biológicos

Desde hace una década el uso de nematodos entomopatógenos se ha desarrollado como una disciplina de la patología de los insectos (Stock y Camino, 1992). Los nematodos representan uno de los Phylum más numerosos dentro del reino Animal, los cuales se encuentran colonizando los medios más diversos y variados. Aunque por referencia se les conoce como los animales dañinos que afectan al hombre, animales y plantas. Sin embargo, existe un grupo de nematodos que parasitan insectos y por sus características bioecológicas constituyen un elemento importante en el control de plagas (Poinar, 1990).

La acción que ejercen los nematodos entomopatógenos sobre los insectos es de modo particular, ya que en algunos casos disminuyen la longevidad, capacidad reproductiva, castración, aparición de intersexos y/o la muerte (Agüera y Laumond, 1994; Kaya y Stock, 1997). Dentro de algunas características importantes del uso de nematodos, Alcázar y Cañedo (2003), citan:

- Su gran capacidad de adaptación a nuevos ambientes y condiciones adversas.
- Su resistencia a productos químicos, compatibles con programas de Manejo Integrado de Plagas.
- Su especificidad por insectos, resultados inocuos para mamíferos.
- Su capacidad de actuar en forma sinérgica con otros entomopatógenos que aumentan su eficacia, y resaltan su potencialidad como biorreguladores de poblaciones de insectos plaga.

- Establecen respuesta de controles rápidos, al ocasionar la muerte de sus hospederos en 48 horas.
- Se puede reproducir de forma masiva ya sea *in vivo* ó *in Vitro*.
- Se pueden almacenar por largos periodos de tiempo.
- Se pueden adaptar a metodologías de aplicaciones convencionales.

La asociación existente entre los nemátodos y los insectos incluyen la forensis, parasitismo facultativo y obligado, siendo este último el de destacar para este estudio. (Stock y Camino, 1992).

En la actualidad algunas de sus especies, son ampliamente reconocidas por su potencial como agentes de control biológico e inundativo (Downes y Griffin, 1996) y causantes de algunas importantes epizootias (Akhurst *et al.*, 1992).

2.2.3 Los nematodos entomopatógenos Steinernematidae y Heterorhabditidae

El orden Rhabditida contiene a la mayoría de los nematodos de vida libre, donde están agrupadas las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, parásitos facultativos (patógenos) de insectos y que representan la principal línea de patogenicidad, que ha dado origen a formas como *Steinernema*, *Neosteinernema* (Steinernematidae) y *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) (Poinar, 1990; Nguyen y Smart, 1994).

El parasitismo de insectos ocasionado por los nematodos pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae y su asociación simbiótica natural, con bacterias específicas del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente, durante años ha llamado la atención por parte de los nematólogos y entomólogos de todo el mundo, el cual es atribuido al éxito como

agentes de control biológico de insectos plaga de importancia económica. A diferencia de otros nemátodos, éstos han desarrollado la habilidad de presentar una asociación mutualista con bacterias, los cuales son transportados en el intestino y liberados en la cavidad corporal de los insectos. (Alcázar y Cañedo, 2003).

Kaya y Gaugler (1993) señalan que los juveniles infectivos de vida libre, no se alimentan, se asemejan y poseen atributos significativos tanto de insectos parasitoides o depredadores, como de patógenos, porque tienen quimiorreceptores y son móviles, tienen un alto potencial reproductivo y una respuesta numérica pero no funcional y porque son altamente virulentos para sus hospederos. Después de su penetración en la cavidad del cuerpo de los insectos, rompen las reacciones de defensa, liberan su bacteria simbiótica que ocasiona una septicemia y la muerte del insecto objetivo. Además, porque estos nemátodos actúan como vectores de las bacterias, tenemos que adoptar el término de nemátodos entomopatógenos, más bien que “entomofílicos”, “entomógenos”, “entomófagos” o “nemátodos parásitos de insectos”.

Poinar y Thomas (1996; citados por Stock y Camino, 1992), comprobaron que la bacteria y sus bioproductos proveen al nematodo los compuestos necesarios para su desarrollo, particularmente de su sistema reproductor. Aunque los nemátodos que no presentan la bacteria son capaces de penetrar en el insecto y provocar su muerte, y si bien logran desarrollarse hasta llegar adultos, en la mayoría de los casos no pueden reproducirse. Por otro lado, las bacterias *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* que transporta el nematodo, no pueden entrar al insecto por sí mismos y necesitan que el nematodo actúe como vector.

Los nematodos entomopatógenos son únicos porque poseen todos los atributos de un agente de control biológico “ideal”, debido al amplio rango de hospederos que presentan, capacidad de búsqueda, desarrollo e introducción de sus bacterias simbióticas dentro del cuerpo de los hospederos; al matar a los insectos dentro de las 24-48 horas siguientes para su desarrollo y reproducción; facilidad relativa de reproducción de los estadios infectivos a gran escala en medios artificiales, sólidos o líquidos, los cuales pueden ser almacenados por largos períodos y mantener su viabilidad y patogenicidad hasta cinco meses a temperaturas bajas, incluso durante 12 meses en refrigeración y ser aplicados por métodos convencionales, persistiendo en el medio ambiente natural (Poinar, 1990; Georgis y Hague, 1991; Kaya *et al.*, 1993). Asimismo, los Steinernematidos y Heterorhabditidos y su bacteria simbiótica, a diferencia de otros patógenos de insectos, en pruebas extensivas han demostrado una completa ausencia de patogenicidad sobre mamíferos, plantas y entomofauna benéfica no objetivos (Gaugler y Boush, 1979; Gaugler, 1981, 1987; Poinar *et al.*, 1982; Timper, *et al.*, 1988).

2.2.4 Rango de hospederos

El interés intenso en los Steinernematidos y Heterorhabditidos, es un reflejo de su impresionante potencial para el control biológico. Significativamente, debido a la bacteria asociada que mata rápidamente a los hospederos, los nematodos no están adaptados al ciclo de vida del hospedero específico y son capaces de parasitar cientos de insectos plagas, este espectro de actividad, es más característico de un insecticida químico que de un biológico (Gaugler, 1988). Al

respecto, Forschler *et al.* (1990) afirman que el mayor factor que determina la susceptibilidad es la capacidad de los nematodos para penetrar a los insectos. Generalmente, la mayoría de estos hospederos susceptibles son aquellos más fácilmente penetrados por los nematodos (Georgis y Manweiler, 1994).

Un aspecto importante que se debe considerar para que pueda realizarse una infección, es la coincidencia espacio temporal del complejo nematodo- insecto, lo que asegura el éxito de control. En este caso, una contribución significativa que proporcionan las especies y cepas de nematodos entomopatógenos es su especificidad contra un amplio rango de hospederos. La mayoría de los Ordenes de insectos, son susceptibles de ser infectados bajo condiciones experimentales, aun recientemente, se reporta su parasitismo en el campo o que son severamente dañinas en el laboratorio. Este control se ha extendido a diferentes estadios metamórficos de diferentes categorías taxonómicas y tróficas, particularmente en insectos plaga del suelo y de hábitat crípticos.

Actualmente el uso de nemátodos entomopatógenos, constituye una alternativa a ser incorporada en los programas de Manejo Integrado de Plagas. Se tiene registros de la utilización de *Steinernema* y *Heterorhabditis* contra insectos como *Spodoptera sp.*, *Agrotis ipsilon*, *Ceratitis capitata*, *Otiorhynchus sulcatus*, *Diabrotica virgifera*, entre otros (Garzon et al., 1996).

En el laboratorio, la mayoría de las especies de nematodos entomopatógenos infectan una variedad de insectos donde reciben el contacto con el hospedero y las condiciones ambientales son óptimas, y no existe ninguna barrera ecológica ni de conducta a la infección (Kaya y Gaugler, 1993). En el campo, los nematodos entomopatógenos atacan un rango apreciablemente más estrecho de hospederos

que en el laboratorio (Akhurst, 1990), añadiendo esta cualidad a su seguridad como agentes de control biológico. Ya que estos nematodos están adaptados al ambiente del suelo, los hospederos principales son insectos de suelo.

2.2.5 Ubicación taxonómica de *Heterorhabditis sp*

Los nematodos entomopatógenos forman parte de la diversidad de formas de vida que habitan el planeta. Debido al extenso y complejo grupo que lo conforman, la clasificación taxonómica provee una sistematización para su estudio y organización, lo que permite ubicarlos jerárquicamente en grupos taxonómicos con base a sus relaciones morfológicas, biológicas y filogenéticas, de acuerdo con los principios, reglas y procedimientos del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica la ubicación taxonómica de *Heterorhabditis sp* es:

Phylum:	Nematoda
Clase:	Secernentea
Orden:	Rhabditida
Suborden:	Rhabditina
Super familia:	Rhabditoidea
Familia:	Heterorhabditidae
Género:	Heterorhabditis
Especie:	<i>Heterorhabditis sp</i>

Posición taxonómica según: CAB International 2005

2.2.6 Características morfológicas del género *Heterorhabditis*

El género *Heterorhabditis* es un entomopatógeno obligado al estadio juvenil. Tiene como características primordiales la doble cutícula y la presencia en la

cabeza de una especie de armadura (diente, protuberancia o espina) en el lado dorsal, los machos presentan bursa. Las hembras jóvenes pueden ser hermafroditas o normales, los machos sólo se producen en la generación de fertilización cruzada. Posee cinco especies reconocidas y varios tipos de cepas, siendo *H. bacteriophora* la de mayor distribución geográfica mundialmente (Kaya y Stock, 1997). A continuación, se describirá con detalle la morfología del género *Heterorhabditis*:

a) Hembras hermafroditas: Después de entrar en el insecto hospedero, los infectivos juveniles se desarrollan en hembras hermafroditas. Cabeza trunca, ligeramente redondeada, seis labios cónicos bien desarrollados, cada uno separados con una papila terminal; una o dos pequeñas estructuras levantadas, algunas veces visibles en la base de cada labio; pequeña abertura amphidial. Estoma ancha pero superficial; presenta cheilorhabdions, formando un anillo, visto lateralmente se asemeja a dos puntos retractiles. Otras partes de la estoma fisionados para formar una porción posterior hundido. La porción posterior de la estoma cubierta por el esófago. El esófago sin el metacarpus; isthmus delgado, bulbo basal abultado; válvula en el bulbo basal reducido. Anillo de nervios en la mitad del isthmus. Poro excretor usualmente posterior al final del esófago. Bulbo medio, como una abertura, rodeado por anillos elípticos; ovotestis amphidelficos, reflejado. Ovíparos, después llegando a ser ovovivíparos. Cola puntiaguda, más larga que el ancho del cuerpo al nivel del ano, usualmente presente un abultamiento postanal. (INAP, 2004)

b) Hembra amphimictica: Similar pero usualmente más pequeña que las hembras hermafroditas; papila labial prominentes. Sistema reproductivo

amphidelfico, vulva no funcional para deposición de huevos, pero funcional para aparearse. (INAP, 2004)

c) Macho: Un testis reflejado espículas pareadas, separadas, ligeramente curva ventralmente. Cabeza de la espícula corta, compensado desde la lámina por una constricción. Gubernaculum usualmente alrededor de la mitad del largo de la espícula, la bursa con 9 pares de papilas genitales. (INAP, 2004)

d) Infeccioso juvenil: Tercer estado de infeccioso juvenil IJ, usualmente con envoltura (cutícula del segundo estado juvenil). Envoltura con un patrón anterior y canales longitudinales; cutícula del IJ estriada con una suave banda marginada por dos aristas en campos laterales. Cabeza con dientes dorsales prominentes. Boca y ano serrado. La estoma aparece como una cámara cerrada con paredes laterales. Esófago e intestino reducido. Poro excretor posterior al anillo de nervios, Células de las bacterias simbióticas presentes en el intestino. Cola punteada. (INAP, 2004)

Los nemátodos entomopatógenos son organismos microscópicos. Pueden variar desde 2 hasta 10 mm (hembras) y de 0.1-0.9 mm (machos) (Kaya y Stock, 1997).

e) Ciclo biológico: Según Kaya y Gaugler (1993), el ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos consta de huevo, cuatro estadios juveniles infecciosos (IJ) y el adulto. El tercer estadio (IJ3) conserva la cutícula del segundo estadio juvenil (IJ2) y lleva la bacteria en su tracto digestivo. Una vez que el nematodo encuentra su huésped penetra a través de aberturas naturales como boca ano y espiráculos, para instalarse en el hemocele. La bacteria sale del intestino del nematodo y pasa a la hemolinfa, se multiplica y mata al insecto hospedante por septicemia. El nematodo se alimenta de la bacteria y del tejido descompuesto del

insecto hospedante, y después emerge a través de la epidermis del insecto como IJ3

2.2.7 Relación nematodo, bacteria y hospedante

La ubicación del insecto hospedante por el nematodo entomopatógeno fue estudiada en *Galleria mellonella* en esta se demuestra que el encuentro con el hospedante es una combinación integrada de comportamientos entre los que destaca la quimiotaxis (Pye y Burman, 1981).

El sustento de la quimiotaxis fue realizado al encontrar solventes acuosos y orgánicos al lavar la superficie de las larvas de *Galleria mellonella* así como también de residuos fecales compuestos por nitrógeno (Schmidt y All, 1979).

El ingreso al insecto hospedante es variable según la susceptibilidad a los nemátodos entre especies y estadios del insecto o también a la forma en que los nemátodos ingresan por las aberturas naturales (boca y ano) o espiráculos (Poinar, 1990).

Según Gaugler (1998) deja entre ver la posibilidad en que en algunos órdenes de insectos los estados larvales avanzados sean los más susceptibles debido a que las aberturas naturales son más grandes. También se alerta la presencia de revestimiento de seda, espinas en los espiráculos y el comportamiento de los Scarabaeidae al tener las patas anteriores para empujar los nemátodos fuera de la boca.

La tolerancia por parte de los nemátodos entomopatógenos a las defensas de un hospedante y la evasión al reconocimiento conllevan a una muerte segura del hospedante (Dunph y Thurston, 1990).

Una característica importante de *Heterorhabditis* es el estar relacionada a la bacteria de la familia Enterobacteriaceae cuyo género es *Photorhabdus*. La bacteria es llevada por los juveniles infectivos (JIs) en el intestino, los JIs penetran la cutícula del insecto hospedante antes de liberar su bacteria simbiótica.

El ciclo de vida incluye huevos, cuatro estadios juveniles (J-1 a J-4) y el adulto. Todos los estados de vida excepto el estado juvenil infectivo, J-3 o “dauer” son hallados dentro del insecto muerto por el nematodo. Los juveniles infectivos (JIs) emergen del cadáver del insecto en el suelo y buscan nuevos hospedantes. La permanencia del nematodo en el suelo no es constante; por lo tanto, se recomienda contar con procedimientos industriales que permitan multiplicarlos fácilmente y a bajo costo.

2.2.8 Relación nematodo - bacterias mutualistas

La asociación mutualista entre los nematodos y las bacterias es única y altamente específica, que involucra una serie de procesos biológicos similares, que les confieren características de mayor virulencia. Los nematodos actúan como vectores y protegen a la bacteria de las condiciones ambientales del suelo y contribuyen significativamente en la patogénesis durante la liberación e invasión del hospedero. Mientras que las bacterias juegan un papel nutricional para el nematodo, al crear condiciones favorables para su desarrollo, reproducción y antibiosis contra otros organismos extraños. En la actualidad el conocimiento de estas interacciones y los efectos detrimentales que ocasionan, también ha estimulado a los científicos para su desarrollo, producción y aplicación en programas de manejo integrado.

Los Steinernematidos y Heterorhabditidos son referidos como entomopatógenos, por su asociación mutualista con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente.

Las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son móviles, Gram negativa, facultativo, no-forman esporas, las barras anaerobias en la familia Enterobacteriaceae. En el género *Xenorhabdus*, existen 5 especies que se asocian con *Steinernema*, mientras que el género *Photorhabdus*, existen 3 especies que se asocian con *Heterorhabditis* con una especie de *P. luminescens*, dividido en cinco subespecies (Hazir, 2003). La subespecie de *P. luminescens* es subsp. *luminescens*, *laumondii*, *akhurstii*, *kayaii* y *thraciaensis* (Boemare, 2002).

Boemare (2002) manifiesta que la diferencia mayor que ocurren entre los dos géneros bacterianos. La mayoría de las *Photorhabdus spp.*, son luminiscente y catalasa positiva, mientras que *Xenorhabdus spp.*, no tienen luminiscencia y es catalasa negativa. La asociación entre la bacteria y el nematodo es esencialmente monoxenica, pero otras especies de bacterias se han aislado de juveniles infectivos de varias especies de Steinernematidos (Lysenko y Weiser, 1974).

Esta relación entre el nematodo y la bacteria es considerada mutualista, porque la bacteria no puede penetrar dentro del hemocele de los insectos hospederos sin el nematodo y estos no pueden crecer y reproducirse en ausencia de la bacteria (Georgis y Poinar, 1994).

Kuno y Hernandez (1982) indican que la asociación nematodo-bacteria es un factor letal importante, ya que la bacteria es responsable de la muerte del insecto, pero necesita al nematodo como medio de transporte hacia el insecto hospedante.

2.2.9 Comportamiento del nematodo entomopatógeno

La capacidad para encontrar y atacar hospederos susceptibles es la clave precisa para determinar la actividad bioinsecticida de los nematodos entomopatógenos y probablemente, es la principal fuente de inconsistencia de los resultados en campo. Los infectivos juveniles tienen numerosas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento que les permite sobrevivir en el ambiente del suelo y les permite localizar nuevos hospederos. Los JIs, toleran el aumento de la temperatura y la desecación comparado a otros estados de vida y tienen grandes cantidades de lípidos almacenados en el cuerpo, esto le sirve como reserva de energía. El estado de juvenil infectivo es un estado en el que no se alimentan, tienen un sistema digestivo colapsado, una boca y ano cerrados. La cutícula del segundo estado forma una envoltura externa que ayuda a proteger a los JIs de situaciones adversas al medio ambiente y la infección microbiana. El comportamiento de los JIs de situaciones adversas del medio ambiente y la infección microbiana. El comportamiento de los JIs que esperan o que buscan a su hospedero puede ser caracterizado como emboscadores (sentar y esperar), intermedios y navegantes (ampliamente buscadores). Los JIs emboscadores (Ambusher) desempeñan un comportamiento referido a como “de pie” en el cual ellos se paran sobre su cola y extienden más del 90 por ciento de su cuerpo en el aire por largos periodos. Ellos también pueden “mover su cuerpo” estando parados. En esta posición pueden saltar; doblando su cuerpo como un lazo apretado y propulsándolo en el aire. El uso de estos mecanismos permite a los nematodos emboscadores entrar en contacto e infectar con gran acierto insectos móviles sobre la superficie del suelo. Los JIs navegantes (Cruisers) están

representados por nemátodos que están constantemente buscando a los insectos hospederos en capas más profundas del suelo y son más efectivos contra insectos sedentarios que se alimentan de las raíces. (Kaya y Stock, 1997).

Aquellos nemátodos que tienen una estrategia de búsqueda intermedia son más efectivos contra insectos plagas que habitan inmediatamente debajo de la superficie del suelo. (Koppenhofer, 2000).

Heterorhabditis tiene un ciclo de vida similar al de los Steinernatidos; pero aun así existen diferencias considerables. Los infectivos juveniles invaden el hemocele, liberan a la bacteria *Photorhabdus luminescens* y matan a su hospedante aproximadamente en 48 horas, los insectos muertos por *Heterorhabditis* se tornan de color rojo, púrpura, naranja o en algunos casos marrón. (Kaya y Stock, 1997).

En la oscuridad los insectos infectados por *Heterorhabditis* presentan luminiscencia por la presencia de la bacteria. El resultado de los juveniles infectivos es hermafrodita a diferencia de los Steinernatidos que presentan hembras y machos, para obtener una nueva generación se necesita de un juvenil infectivo. Los huevos dejados por los hermafroditas se desarrollan como hembras y machos. Estos producirán huevos que llegaran a ser infectivos juveniles, quienes si encuentran humedad adecuada saldrán del hospedero a infectar otros insectos. (Kaya y Stock, 1997).

Los juveniles infectivos entran al insecto hospedero a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) y penetra al hemocele (Bedding, 1982).

Una vez en el hemocele, los juveniles liberan las bacterias, se multiplican y matan al insecto en 48 horas. Los nematodos dentro del insecto se alimentan de

las células bacterianas y degeneran el tejido del hospedero, produciendo dos o tres generaciones y emergiendo del cadáver los juveniles buscando nuevos hospederos. Cada juvenil de Heterorhabditidae, tiene el potencial de reproducción, y se desarrolla en un individuo hermafrodita en la primera generación. Los huevos liberados por el hermafrodita en el cadáver del insecto se desarrollan en adultos anfimíticos (machos y hembras) que inician un nuevo ciclo de vida y los huevos que permanecen en el cuerpo del hermafrodita desarrollan juveniles infectivos. (Kaya, 1993).

2.2.10 Factores abióticos que influyen en los nematodos entomopatógenos

2.2.10.1 Condiciones edafológicas

a) La textura y estructura del suelo

Ambos factores afectan el movimiento y la persistencia de nematodos como la textura del suelo y tamaño de poro. Los nematodos son incapaces de moverse entre partículas de suelo cuando los diámetros de poro son menos que el ancho del cuerpo, así que su habilidad de la dispersión disminuye conforme los porcentajes de limo y arcilla se incrementan en el suelo. Un suelo que contiene más de 20 % de arcilla puede restringir la migración de *Steinernema* (Ames y Smart, 1989); en suelos arcillosos, aun en la presencia de hospederos no puede aumentar la dispersión del juvenil infectivo (Georgis y Poinar, 1983). Los nematodos entomopatógenos pueden emigrar horizontal y verticalmente (Georgis y Poinar, 1983). *Heterorhabditis spp.* Exhibe una mayor movilidad que *Steinernema spp* (Georgis y Poinar, 1983).

b) Humedad del suelo

Los nematodos que habitan en el suelo necesitan un medio aeróbico y acuático para sus actividades y el contenido de humedad del suelo, que puede fluctuar ampliamente, es por lo tanto crítico (Simons, 1973).

Es conocido que las larvas infectivas son capaces de sobrevivir a la desecación por periodos relativamente largos. La sobrevivencia del nematodo depende de la proporción de desecación; la proporción más lenta (comienza de un ambiente saturado) la más grande para la oportunidad de sobrevivencia. (Kamionek et al., 1974)

Kaya (1990) describe como la humedad del suelo tiene un gran impacto sobre la capacidad de búsqueda del hospedero y la actividad infectiva de los nematodos entomopatógenos, como lo hacen la temperatura y textura del suelo y destaca que la humedad, es un factor central que afecta la actividad del nematodo en el suelo y la variabilidad en el control de la eficacia es atribuida a la ineficiencia de la humedad del suelo (Lewis y Raun, 1978), sin embargo, conforme la humedad incrementa el llenado de aire de los espacios, en los poros disminuye y la respiración es inhibida. En suelos mojados o saturados, el movimiento de los nematodos puede ser restringido debido a la poca tensión superficial necesariamente forzosa para el movimiento (Wallace, 1971). El desplazamiento en suelos secos también puede ser restringido debido a que los nematodos se vuelven quiescentes o anhidroticos (Womersley, 1990).

Por consiguiente, la humedad del suelo a menudo es citada como el factor más crítico para la supervivencia y movimiento de los nematodos entomopatógenos (Klein, 1990; Georgis y Gaugler, 1991).

c) La temperatura del suelo

La temperatura influye en proporción a las reservas alimenticias que son utilizadas por los nematodos y afectan la sobrevivencia de larvas infectivas de *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Entre los nematodos entomopatógenos, existe una considerable variabilidad inter e intraespecífica en la tolerancia de temperatura. Al respecto, Molineux (1986) en un estudio señala en general, la baja actividad entre los Heterorhabditidos promedio temperaturas desde 10 a 16 °C, y entre los Steinernematidos desde 3 a 14 °C, pero el rango de temperatura difiere por la infectividad entre los nematodos del mismo género y de la misma especie y cepa. El suelo libera su calor casi totalmente del sol y un aumento pequeño en la temperatura que se presenta en suelo seco sujeto a la misma entrada de calor en la superficie. El calor solar penetra más profundo en el suelo mojado pero el aumento resultante en la temperatura es menos que en el suelo seco. Las capas más profundas amortiguan más que la superficie, que tienden a calentarse arriba y enfriarse hacia abajo con la atmosfera y bajo la influencia de luz directa del sol (Richardson y Grewal, 1994)

El rango de temperaturas sobre los nematodos a la que pueden sobrevivir, infectar y reproducir varía entre cepas y especies. Los periodos cortos a temperaturas extremas bajas no parecen ser catastróficas a las poblaciones de nematodos como las temperaturas altas. Las temperaturas por arriba de 35 °C, sobre un periodo extendido de tiempo, son invariablemente perjudiciales a los juveniles infectivos. Generalmente estas condiciones no se experimentan en el campo a menos que el cadáver de hospedero se coloque cerca de la superficie del

suelo. A mayor profundidad en el suelo, los infectivos se protegen de ambientes extremos (Kaya, 1990).

d) El pH del suelo

Los efectos del pH en el suelo sobre la sobrevivencia e infectividad de nematodos Rhabditidos parásitos de insectos no han sido estudiados extensamente. Sin embargo, la evidencia disponible sugiere que los infectivos pueden tolerar una gran variedad de pH del suelo y por eso ni su eficacia ni su persistencia son probables de ser afectados adversamente por el espectro de pH de la mayoría de los suelos agrícolas (Kaya, 1990).

e) Aireación del suelo

Los nematodos son organismos aerobios y la disponibilidad baja de oxígeno puede reducir su supervivencia (Evans y Perry, 1979; Wharton, 1986). El promedio de este elemento en el aire atmosférico es de 21 % y en la capa arable del suelo 20,3 %. Bajo condiciones extremas en la capa arable ha sido reportado más bajo del 1 %. La aireación es dependiente de la fracción de los poros llenos de aire y los poros macroscópicos que drenan rápidamente. Por lo tanto, la falta de oxígeno limita la actividad biológica a bajos potenciales de agua. Sin embargo, muchos de los poros en potenciales altos de agua están llenos y puede hacerse limitante. También los organismos agregados en suelos de textura fina pueden ser adversamente afectados por localizadas condiciones anaeróbicas (Barbercheck, 1992).

El porcentaje de oxígeno en el suelo disminuye con la profundidad y la tasa disminuye más rápido en suelos arcillosos o limosos que en los arenosos (Brady,

1974). De este modo, puede ser un factor limitante en los suelos con un alto contenido de materia orgánica o de arcilla (Kaya, 1990).

Por otro lado, bajo condiciones normales en campos agrícolas donde conservan altos niveles de humedad suficientes para apoyar el crecimiento de los cultivos, la atmosfera del suelo está siempre cercanamente a vapor saturado. Esta condición es físicamente apropiada para el control biológico de insectos del suelo por organismos que requieren humedad relativa alta, tales como los nematodos y hongos entomopatógenos. Los Steinernematidos y Heterorhabditidos pueden sobrevivir a < 97 % HR en un estado inactivo y se comprueba que la desecación ocurre ligeramente. (Womersly, 1990).

f) Clima

Los nematodos Steinernematidae y Heterorhabditidae tienen una distribución mundial, y han sido aislados de una amplia variedad de ecosistemas desde los climas subárticos al árido y tropical (Poinar, 1990; Hominick et al., 1997).

De esto se especula que las poblaciones naturales de los nematodos deben estar adaptadas a sus ambientes locales (Glazer, 1996).

2.2.11 Factores bióticos que influyen en los nematodos entomopatógenos

a) Los patógenos microbianos

En ecosistemas naturales, los organismos que habitan en el suelo, en varios niveles tróficos, viven en un estado de homeostasis ecológico. Los nematodos introducidos en tales ambientes se enfrentan a la depredación y parasitismo por la fauna endémica del suelo. Una gran variedad de virus, bacterias, hongos y protozoarios se presentan naturalmente en suelos reducen las poblaciones de

nematodos parásitos de plantas y han sido notados como probables candidatos para el control biológico de nematodos; los Heterorhabditidos y Steinernematidos son susceptibles a varios de estos antagonistas. La mayoría de los antagonistas bacterianos de nematodos ha recibido poca atención y las enfermedades víricas de nematodos son virtualmente un grupo desconocido (Sayre y Starr, 1998). Las epizootias de nematodos pueden presentarse regularmente en un suelo, pero es desapercibido y sin registrar.

b) Ecología de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos han sido recuperados del suelo y de insectos infectados naturalmente. Para poder aplicarlos como agentes de control biológico, es necesario conocer las múltiples interacciones con su medio ambiente. El impacto que ejercen sobre ellos los factores bióticos y abióticos es una limitante para su comportamiento, eficacia, dispersión y supervivencia. Este conocimiento establece las bases para futuros estudios sobre la dinámica poblacional y la epizootiología de las enfermedades, lo que permite optimizar su potencial bioinsecticida en programas de control biológico y manejo integrado de plagas.

La dispersión, además de saltar para alguna especie de nematodo, los juveniles infectivos se pueden dispersar en el suelo hasta 90 cm en ambas direcciones horizontales y verticales dentro de 30 días (Kaya, 1990). Esta dispersión, especialmente para nematodos navegadores, le permite a los nematodos entomopatógenos para buscar activamente a hospederos. Los factores que influyen en la movilidad de los juveniles infectivos son la humedad, la temperatura y la textura de suelo, de las cuales la humedad es la más crítica porque los nematodos necesitan una película de agua en los espacios interiores del

suelo para la propulsión efectiva. Cuando esta película de agua llega a ser fina también (en suelo seco) o los espacios interiores llegan a estar llenos completamente de agua (en suelo saturado), el movimiento de nematodo es restringido (Koppenhofer et al., 1995).

c) Dispersión de los nematodos entomopatógenos en el suelo

Los nematodos por ellos mismos tienen poder de dispersión limitado, pero pueden ser conducidos por los insectos y también probablemente por las aves y otros animales. Indudablemente, los humanos incluso sin saberlo transportan nematodos en el suelo alrededor de las plantas o en cascajos de arena. Cuando la emigración e inmigración ocurre, el primer resultado benéfico es el flujo de diversidad genética para la existencia de poblaciones, más bien que el establecimiento completo de las nuevas poblaciones (Griffin y Downes, 1991; Poinar, 1991). Lacey et al. (1993) señalan que una variedad de nematodos entomopatógenos que predominantemente infectan larvas, también ocasionalmente o hasta comúnmente es observada en insectos adultos. Esta infección puede servir para facilitar la transmisión del patógeno o los subsecuentes estadios de vida en el hábitat inmediato, y/o facilitar su dispersión a otras localidades.

2.3 Definición de términos básicos

- a) **Nematodos entomopatógenos:** Son un grupo de nematodos que causan la muerte a los insectos, viven parasitariamente dentro del huésped infectado (Cranshaw y Zimmerman 2013)

- b) **Control biológico:** Es un método de control de plagas, que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo (Barrera 2006).

2.4 Formulación de hipótesis

2.4.1 Hipótesis general

- a) La principal causa de los bajos rendimientos de los cultivos en la provincia Daniel Alcides Carrión serán ocasionados por los nematodos?

2.4.2 Hipótesis específicos

- a) La condiciones de diferentes altitudes, tipo de suelo y cultivos en el distrito de Yanahuanca afectarán la presencia de generos de nematodos entomopatogenos

2.5 Identificación de variables

Se considero una solo variable que fue aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos.

2.6 Definición operacional de variable e indicadores

Variable	Dimensión	Indicadores
Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos	Generos	Lugares Altitud Tipo de suelo pH

Elaboración propia 2018

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de investigación

La investigación desarrollada fue del tipo no experimental con diseño descriptivo, buscando las cualidades o atributos de la población objeto del estudio.

3.2 Métodos de investigación

Durante la investigación se emplearon los siguientes métodos:

Método documental y bibliográfico: Consistió en tomar información de datos estadísticos con respecto a los indicadores a evaluar en el cultivo de lechuga, las mismas que nos sirvieron para revisar artículos científicos publicados por organismos especializados en el tema.

Método estadístico: Considerado con el fin de recopilar, organizar, codificar, tabular, presentar, analizar e interpretar los datos obtenidos en la muestra de estudio durante la investigación.

3.3 Diseño de la investigación

En la investigación se realizó un análisis haciendo uso de la estadística descriptiva (frecuencias en porcentaje y medias)

3.4 Población y muestra

Con el fin de contar con un material homogéneo y permanente de la polilla de la cera *Galleria mellonella* L. en su estado larva, se adquirió del Programa Nacional de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria

SENASA Lima. La población estuvo constituida por 1 millar de larvas y la muestra fue de 5 larvas por 40 muestras de suelo haciendo un total de 200 larvas.

3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos que se utilizaron en la investigación fueron: la observación, fichas de registros de datos.

3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Las técnicas y procesamiento de datos fue en base a porcentajes y medias.

3.7 Tratamiento estadístico

Por ser una investigación no experimental, descriptivo se considero lugares de muestreo, para aislar e identificar los nematodos entomopatogenos en la provincia Daniel Alcides Carrión.

3.8 Selección, validación y confiabilidad de los instrumentos de investigación

El trabajo de investigación por su naturaleza de ser descriptivo y por desarrollarse en el laboratorio fue validado por el personal encargado del Laboratorio de la Escuela de Agronomía y por el Centro Internacional de la Papa CIP-Lima.

3.9 Orientación ética.

Se aplicó los principios éticos respecto al derecho de los participantes informado del propósito de la investigación, solicite el permiso, observe y cumplí

con las reglas de la UNDAC- Agronomía y los agricultores garantizando su confidencialidad y anonimato, no revelando su identidad ni identificar quienes proporcionaron información, asimismo solicite a los participantes proporcionen su consentimiento explícito de su colaboración, sin criterios de exclusión arbitraria con el fin de obtener informar sin presiones para posteriormente efectuar una crítica fundada y objetiva de los resultados y de ser el caso, proponer cambios sustanciales.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Descripción del trabajo de campo

4.1.1 Lugar de ejecución

La colección de muestras de suelo se realizó durante los meses de agosto y setiembre del 2014, tomando en cuenta los lugares perturbados y no perturbados por el hombre, ubicadas a diferentes altitudes en el Distrito de Yanahuanca, Provincia Daniel Alcides Carrión, Departamento de Pasco (Figura 1).



4.1.2 Descripción del sistema agroecológico del distrito de Yanahuanca

El Distrito está conformado por diferentes tipos de relieves que caracterizan y configuran todo el territorio: Las Altiplanicies, constituyen las partes altas del distrito que varían entre los 2100 y 3850 m.s.n.m., siendo la altitud distrital de

3185 m.s.n.m. con superficies inclinadas algo onduladas, donde se desarrolla especialmente la crianza de ganado Ovino, Vacuno, Porcino y Alpacuno. Las Altiplanicies disectadas, que son las tierras resultantes de las anteriores por destrucción parcial originada por erosiones a causa de lluvias e incisiones profundas de las corrientes hídricas.

Las Vertientes montañosas, constituyen las vertientes de inclinación con pendientes de 10° a 40°. Zonas de ocurrencia de desplazamientos, más que zonas morfológicas, son procesos erosivos ocasionados por la inestabilidad de superficies existentes.

Dentro de la caracterización climatológica existen dos tipos de clima en el año: el seco y el lluvioso. En cuanto al clima seco, este se da entre los meses de mayo y noviembre y el lluvioso, entre diciembre y abril. En términos generales, el clima varía entre seco y semi frío, en las zonas de 3,300 m.s.n.m. hasta seco frígido en los pisos altoandinos de 3,850 m.s.n.m. a más, asimismo en los pisos ecológicos inferiores a los 3.300 m.s.n.m, hasta 2,100 m.s.n.m. El estadio climático va evolucionando hasta un nivel de mayores temperaturas y niveles de humedad.

La variedad de las temperaturas se produce según el piso altitudinal. La zona comprendida entre 2,834 a 3,658 m.s.n.m. tiene valores promedio que varían entre 18 °C y 9 °C en tanto que en la zona alta a más de 3,300 m.s.n.m. las temperaturas promedio varían entre los 6.1 °C y los 3.5 °C, donde son perceptibles fuertes vientos gélidos que se acentúan en horas de la tarde y noche de las épocas de seco. (Portal Municipal de la Provincia Daniel Alcides Carrión, 2014).

4.1.3 Material de laboratorio

Materiales de Vidrio

- Matraces Erlenmeyer 1000 ml
- Matraces Erlenmeyer 500 ml
- Matraces Erlenmeyer 250 ml
- Tubos de Prueba 16 * 150 ml
- Placas Petri 15 * 100 mm
- Placas Petri 5 * 100 mm
- Probeta graduada de 100 ml
- Tubos eppendorf
- Embudo
- Bagueta
- Vasos de Precipitación

Reactivos

- Hipoclorito de Sodio
- Detergente
- Alcohol 96 %

Equipos

- Balanza
- Estereoscopio
- Contómetro
- Pipeta micrométrica
- Microscopio
- Cámara

- GPS (Global Position System)

Otros

- Picota
- Lampa
- Palitas de Jardinería
- Papel Filtro
- Pinzas
- Bandejas
- Plumón Indeleble
- Bolsas plásticas
- Recipientes de plástico de 500 g y 1 kg. de capacidad.
- Navajas

4.1.4 Muestreo de campo.

Los muestreos de suelo se realizaron a diferentes altitudes en la microcuenca de río Chaupihuaranga. Los puntos de muestreo se determinaron a diferentes altitudes con la ayuda de un GPS, los puntos para tomar las muestras fueron distribuidas en función de la altitud iniciando desde comunidad campesina de Chipipata, por el cual se fue descendiendo hasta llegar al punto final que fue el borde del río Chaupihuaranga en Lucmapampa.

En cada punto de muestreo se tomaron cinco submuestras a una profundidad de 15 cm en un área aproximada de 20 m² por cada muestra obtenida, los cuales fueron colocados y homogenizados en una bolsa de polietileno correspondiendo el total a una sola muestra; las muestras remitidas tuvieron un peso de 1000 g estas

fueron identificadas con los datos técnicos relevantes de identificación y caracterización, en la tarjeta de identificación. (Anexo 1).

En cada punto designado a una misma localidad se recogió 5 muestras a distanciamientos diferentes cada una a un distanciamiento de 20 m entre muestra y muestra de un mismo punto, haciendo un total de 5 kilos por localidad de muestreo, cada muestra en cada punto contenía 1 kilo por bolsa el número total de puntos de muestreo fueron 8 cada una con 5 muestras haciendo un total de muestras de 40 muestras. En cada toma de muestra, los materiales que se utilizaron fueron desinfectados con alcohol al 70 % (Alcázar y Cañedo, 2003). Las muestras fueron remitidas al laboratorio en bolsas conservando el estado húmedo del suelo.

1 Materiales de campo usados en la recolección de muestras.



2 Limpieza del área de muestreo



3

Cada punto de muestreo se tomó a una profundidad de 10 a 20 cm

4

Se tomaron cinco sub muestras para hacer una sola muestra.



5

Muestras tomadas de áreas cultivadas como nativas



Fig. 2 Recolección de muestras en el distrito de Yanahuanca (Elaboración propia 2014).

Cuadro 1. Datos de cada uno de los 8 puntos de muestreo, número de muestra, altitud, latitud, longitud, nombre del lugar de muestreo, características.

DISTRITO	YANAHUANCA	FECHA: agosto 2014	COORDENADAS GEOGRÁFICAS			
PUNTO DE MUESTREO	Nro DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
1	1.1	3577 msnm	10°29'22.8" S	76°32'58.30" W	Chipipata	Cultivo de habas
1	1.2	3633 msnm	10°29'94.80" S	76°31'64.50" W	Chipipata	Campo en descanso
1	1.3	3642 msnm	10°30'12.00" S	76°31'56.20" W	Chipipata	Cultivo de maíz
1	1.4	3655 msnm	10°30'12.60" S	76°31'55.30" W	Chipipata	Cultivo de beterraga
1	1.5	3658 msnm	10°30'19.50" S	76°31'52.40" W	Chipipata	Cultivo de habas
PUNTO DE MUESTREO	Nro DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
2	2.1	3506 msnm	10°28'93.00" S	76°29'04.30" W	Roco	Cultivo de maiz
2	2.2	3419 msnm	10°29'00.2" S	76°29'13.30" W	Roco	Cultivo de Haba
2	2.3	3396 msnm	10°29'03.90" S	76°29'31.80" W	Roco	Alfalfa
2	2.4	3349 msnm	10°29'11.40" S	76°29'32.20" W	Roco	Maíz
2	2.5	3364 msnm	10°29'12.00" S	76°29'29.20" W	Roco	Campo en descanso
PUNTO DE MUESTREO	Nro DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
3	3.1	3377 msnm	10°29'37.00" S	76°29'62.60" W	Huaylashjirca	Cultivo de Habas
3	3.2	3418 msnm	10°29'55.00" S	76°29'81.20" W	Huaylashjirca	Cultivo de Beterraga
3	3.3	3400 msnm	10°29'54.30" S	76°29'88.00" W	Huaylashjirca	Cultivo de papa
3	3.4	3330 msnm	10°29'47.50" S	76°29'78.30" W	Huaylashjirca	Cultivo de maíz
3	3.5	3303 msnm	10°29'24.50" S	76°29'38.20" W	Huaylashjirca	Campo en descanso
PUNTO DE MUESTREO	Nro DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
4	4.1	3028 msnm	10°29'42.40" S	76°30'86.20" W	Yanahuanca	Cultivo de flores
4	4.2	2979 msnm	10°29'39.20" S	76°30'45.70" W	Yanahuanca	Cultivo de chíá
4	4.3	3310 msnm	10°29'61.80" S	76°31'18.70" W	Yanahuanca	Cultivo de rocoto
4	4.4	3323 msnm	10°29'65.50" S	76°31'25.30" W	Yanahuanca	Cultivo de papa
4	4.5	3300 msnm	12°23'15.05" S	75°03'40.34" W	Yanahuanca	Especie vegetal Muña

PUNTO DE MUESTREO	NUMERO DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
5	5.1	3016 msnm	10°26'24.10" S	76°28'68.40" W	Lucmapampa	Cultivo de papa
5	5.2	3023 msnm	10°27'93.80" S	76°29'34.70" W	Lucmapampa	Cultivo alfalfa
5	5.3	3036 msnm	10°28'35.70" S	76°29'57.20" W	Lucmapampa	Cultivo de maíz
5	5.4	3060 msnm	10°28'55.50" S	76°29'57.50" W	Lucmapampa	Cultivo de maíz
5	5.5	3050 msnm	10°28'55.00" S	76°29'55.50" W	Lucmapampa	Terreno en descanso
PUNTO DE MUESTREO	NUMERO DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
6	6.1	3453 msnm	10°30'19.50" S	76°31'52.40" W	Yanacocha	Cultivo de alfalfa
6	6.2	3567 msnm	10°27'87.90" S	76°30'14.10" W	Yanacocha	Cultivo de haba
6	6.3	3435 msnm	10°28'13.5" S	76°30'14.40" W	Yanacocha	Cultivo de papa
6	6.4	3333 msnm	10°28'64.20" S	76°30'13.70" W	Yanacocha	Cultivo de Maíz
6	6.5	3330 msnm	10°28'64.80" S	76°30'15.80" W	Yanacocha	Campo en descanso Kikuyo
PUNTO DE MUESTREO	NUMERO DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
7	7.1	3279 msnm	10°29'72.50" S	76°32'92.10" W	Villo	Cultivo de papa
7	7.2	3268 msnm	10°29'70.80" S	76°32'93.10" W	Villo	Cultivo de lechuga
7	7.3	3375 msnm	10°29'22.40" S	76°32'58.90" W	Villo	Cultivo de Maíz
7	7.4	3387 msnm	10°29'22.80" S	76°32'58.30" W	Villo	Terreno en descanso
7	7.5	3362 msnm	10°28'98.80" S	76°31'93.10" W	Villo	Cultivo de maíz
PUNTO DE MUESTREO	NUMERO DE MUESTRA	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS
8	8.1	3413 msnm	10°29'78.80" S	76°34'21.107" W	Chinche	Forestal
8	8.2	3366 msnm	10°29'81.10" S	76°34'32.00" W	Chinche	Cebolla
8	8.3	3363 msnm	10°29'81.40" S	76°34'28.60" W	Chinche	Alcacer pasto
8	8.4	3480 msnm	10°30'45.60" S	76°35'25.80" W	Chinche	Descanso
8	8.5	3556 msnm	10°30'95.60" S	76°35'02.50" W	Chinche	Descanso

4.1.5 Laboratorio

a) Adquisición de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Las larvas requeridas para desarrollar las pruebas de patogenicidad fueron adquiridas del Programa Nacional de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA Lima. Los estadios larvales son 8: estos lo realizan en 35 días y la prepupa forma un cocón duro del cual emerge el adulto en 15 días. (ver fig.3)



Figura 3. Frasco con larvas de *Galleria mellonella*

b) Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos se aislaron en forma indirecta haciendo uso de larvas del último estadio de *Galleria mellonella*. Las muestras fueron colocadas en dos frascos de 500 cm³ aproximadamente de 350 g de suelo por frasco, dejando un remanente de 300 g. de suelo para su posterior análisis siempre en cuando resultara positivo el aislamiento de los nematodos, sobre la superficie de estos frascos con el suelo se colocaron cinco larvas de *Galleria mellonella* del

ultimo estadio, el suelo se encontraba en capacidad de campo, se taparon los frascos invirtiendo su posición haciendo que las larvas se muevan libremente a través del suelo exponiéndose y permitiendo mayor oportunidad de encontrar un juvenil infectivo (IJs), dejándolos los frascos luego al ambiente.

En la evaluación se registraron larvas vivas, larvas muertas, larvas infectadas con hongos, larvas infectadas con bacterias y larvas infectadas con nematodos. Los síntomas registrados por la infección de *Heterorhabditis* fueron: cadáveres hinchados con coloración rojiza o púrpura (Fig. 4) y presencia de bioiluminescencia (Kaya y Stock. 1997).



Fig. 4. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por entomopatógenos.

Con la finalidad de identificar a los nematodos recuperados de las trampas con *Galleria mellonella*, estas fueron identificados mediante el uso de un Estereoscopio. La identificación del género fue realizada en el Centro Internacional de la Papa CIP-Lima, con la ayuda del científico reconocido Jesús Alcázar, en la que se reportó que para todos los nematodos entomopatógenos

encontradas en las muestras que dieron positivos pertenecen al género *Heterorhandithis*. Los colores de los cadáveres se registraron de 4 a los 8 días después de muertos los insectos, para los nematodos *Heterorhabditidos* mostraron un color rojo o naranja y estos fueron disectados de 8 a los 10 días.

1 Tamizado y preparado de todas las muestras de suelo.



2 Muestras de suelo colocados en frascos de 500 cc.



3 En la superficie se colocaron cinco larvas de *G. mellonella* del ultimo



4 Frascos tapados para luego ser invertidos.



5

Almacenamiento de todas las muestras para ser evaluadas en siete días.

6

Larva infectada por nematodo entomopatogeno del genero *Heterorhabditis*.



Fig. 5 Aislamiento de nematodo entomopatogeno y características de la larva de *Galleria mellonella* infectada (Elaboración propia 2014)

c) Recuperación de nematodos entomopatógenos

Para la recuperación de los nematodos entomopatógenos se hizo uso de **trampas White**, el cual está formado por una placa Petri grande (15 cm de diámetro) en el que se puso 35 cc de agua y otra placa Petri más pequeña (9 cm de diámetro). Dentro del mismo se colocó un papel filtro húmedo y sobre este se colocó las larvas con los síntomas de infestación de nematodos entomopatógenos, estas larvas fueron trasladados con mucho cuidado a trampas White evitando que se rompan ya que los nematodos en estados no infectivos podrían salir. (Fig. 6)

Los Nematodos entomopatógenos empiezan a salir del cadáver cuando llegan al tercer estadio juvenil (juveniles infectivos) luego de aproximadamente de 10 días

en *Heterorhabditis*. Los nematodos se movilizan por el papel húmedo hasta llegar al agua de la placa Petri donde quedan atrapados debido al higrotropismo positivo que poseen. Se recolecta el agua con los nematodos y se renueva el agua en la trampa ya que después de cuatro días se realizó una segunda cosecha y luego de otros cuatro días la tercera y última cosecha. Se obtuvieron alrededor de 15000 a 30000 Jis de nematodos entomopatógenos por larva de *Galleria mellonella*. Posteriormente salieron más nematodos, pero fueron descartados por ser adultos no infectivos.

Una vez que fueron cosechados los nematodos entomopatógenos fueron traspasados a recipientes con agua. Estos recipientes se colocan en forma inclinada por unos 20 minutos para que repose el agua y los nematodos lleguen al fondo del recipiente por decantación. Se repite este proceso de lavado cambiando el agua tres veces. Se descartó el agua sobrenadante y se colectó los nematodos entomopatógenos para su almacenamiento. (Fig. 6)

La emergencia de los infectivos juveniles varía de acuerdo a la especie; para el caso de *Heterorhabditis* es de 14 a 15 días después de la infección (Kaya y Stock, 1997; Alcázar y Kaya, 2003).

Para confirmar los postulados de Koch y la patogenicidad de los nematodos patógenos aislados (Fig. 5), se colocó en placas petri con papel filtro estéril, larvas de ultimo estadio de *Galleria mellonella* que se inocularon con 10 IJs/ Larva (Kaya y Stock, 1997).

1

Proceso evaluación de las muestras de suelo



2

Recuperación de larvas con nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis*.



3

Inspección de todas las muestras en detalle observando larvas con nematodo entomopatógeno

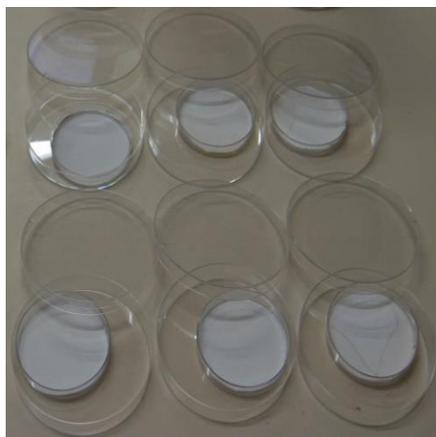


4

Larvas muertas recuperadas lavadas con agua destilada.



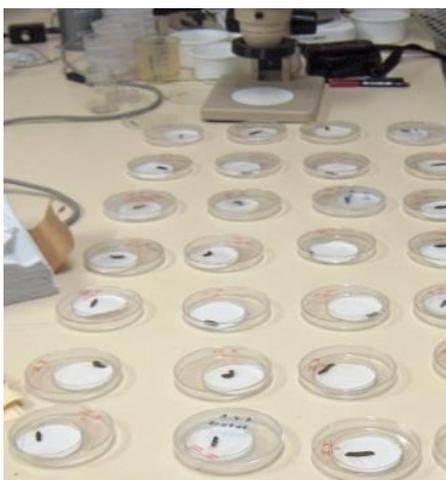
5 Placas Petri listas para usarlo en la recuperación de nematodos entomopatógenos



6 Trampas White



7 Trampas White, 14 a 15 días de la infección se produce la emergencia



8 Emergencia de los infectivos juveniles.

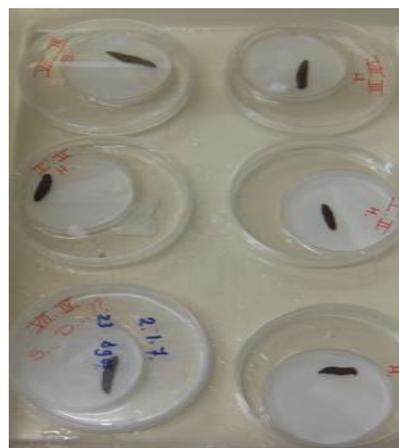


Fig. 6 Uso de trampas White. (Elaboración propia 2014).

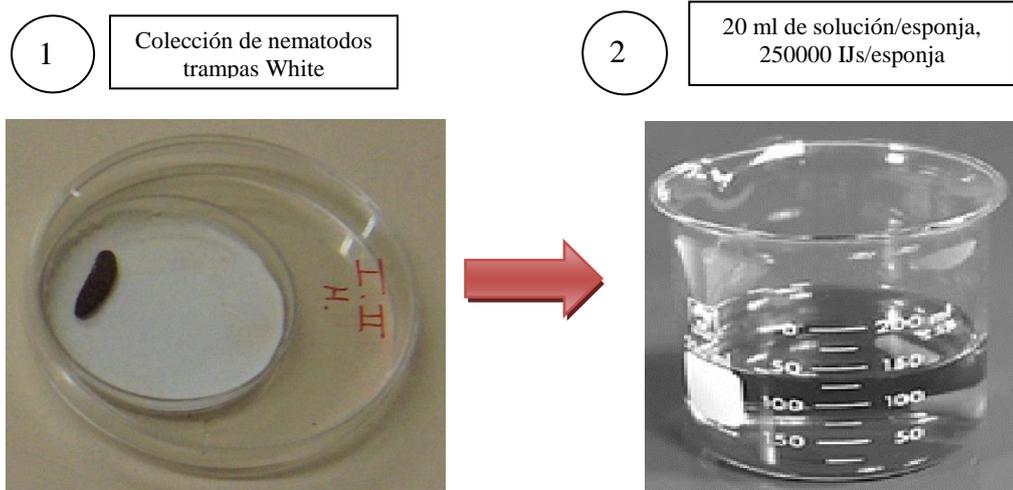
d) Almacenamiento de nematodos entomopatógenos

Para el almacenamiento se emplearon placas Petri de 15 cm de diámetro el cual contenían una delgada lámina de agua, extendida lo más posible, y que puedan ser tapados ligeramente. Se agregó dos gotas de bicarbonato al 1 % en el agua para

evitar que los nematodos entomopatógenos se peguen entre sí por sus excrementos. En cada placa Petri se puso 30 ml de agua destilada con una concentración de 7 000 nematodos entomopatógenos aproximadamente, no se sellaron los recipientes para facilitar el paso de aire fresco al interior.

Obtenida la solución concentrada de nematodos algunos de los nematodos entomopatógenos se almacenaron en esponjas, dos de las esponjas de 8 cm de diámetro estas fueron colocadas dentro de un frasco con tapa y llevadas a 20 °C; cada esponja absorbe un máximo de 20 ml y se almacena 250 000 IJs aproximadamente. Las fundas deben ser selladas con calor y apiladas dentro del refrigerador.

Con esta metodología se puede almacenar nematodos entomopatógenos por un periodo más largo 4 o 6 meses con la ventaja de que no hay pérdida de agua por evaporación y la renovación de los nematodos entomopatógenos y la renovación del material fue al final del almacenamiento. (Fig.7) (Alcázar y Cañedo, 2003).



3

Recipientes de plástico de 500gr de capacidad



4

2 esponjas/frasco, 8 cm de diámetro cada esponja



5

Vaso de precipitación conteniendo nematodos, asentamiento para poder obtener mayor concentración.



Fig. 7 Almacenamiento de Heterorhabditis. (Elaboración propia 2014)

e) **Conteo de nematodos entomopatógenos**

El conteo de nematodos se realizó utilizando el método de dilución volumétrica (Kaya y Stock, 1997; Alcázar y Cañedo 2003). Este método consiste en colocar 0.1 ml de la solución con nematodos en una placa Petri rayada o dividida, para realizar el conteo directo de los nematodos (Ver fig. 8). Este procedimiento se repitió tres veces, la concentración se obtiene mediante la relación:

$$\text{Concentración en Suspensión (IJs/ml)} = \frac{\text{IJs contados}}{0.1 \text{ ml}}$$

$$\text{Numero de IJs en suspensión} = \frac{\text{IJs contados}}{4.2 \text{ ml}} * \text{Suspensión total}$$



Fig. 8 Nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* en solución en placa Petri.

f) Mantenimiento de nematodos entomopatógenos

Kaya y Stock (1997), proponen el mantenimiento de los nematodos entomopatógenos colocando un mililitro de la suspensión de IJS a una concentración de 200 nematodos/ ml, sobre un disco de papel filtro Whatman No 1 de 9 cm. de diámetro, dispuesto dentro de una placa Petri. Seguido se colocaron 10 larvas de *Galleria mellonella* sobre el papel filtro. Así se establece una proporción de 20 nematodos por larva esta metodología resulta óptima para la

obtención de una abundante progenie y evita la contaminación con bacterias saprofitas. Estas placas fueron dejadas a medio ambiente. A los ocho días de producida la infección se colocaron en trampas White y colectadas para su conservación como se indicó anteriormente. (Fig. 9).

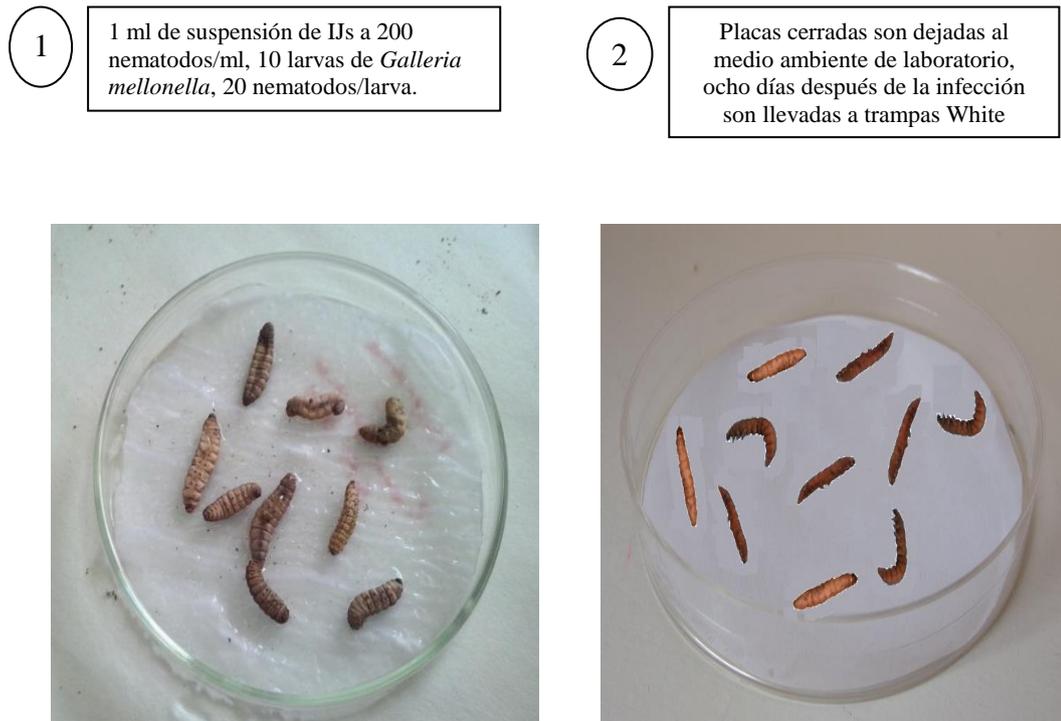


Figura 9. Mantenimiento de nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis*. (Elaboración propia)

4.2 Presentación, análisis e interpretación de los resultados

4.2.1 Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos.

Se realizó el aislamiento teniendo en consideración el muestreo sistemático de las 8 localidades del distrito de Yanahuanca, encontrándose 7/40 muestras con nematodos entomopatógenos donde se obtuvieron 4 muestreos positivos (17,5 %)

con nematodo entomopatógeno del género *Heterorhabditis*, Las distribuciones relativas de los lugares positivas fueron las siguientes: la localidad de Villo con una muestra 2,5 %, Roco con dos muestras 5,0 %, Yanahuanca con una muestra 2,5 % y Chinche con tres muestras 7,5 %, no se localizó ningún nematodo en Chipipata, Huaylashjirca, Lucmapampa y Yanacocha. La determinación del género fue realizada con el apoyo del Centro Internacional de la Papa.

Cuadro 2. Lugares de muestreo, muestreos positivos y porcentaje de muestras positivas en el distrito de Yanahuanca.

Lugares de muestreo	Total de muestreo	Muestras positivas	Porcentajes %
1. Roco	5	2	5
2. Villo	5	1	2,5
3. Chinche	5	3	7,5
4. Yanahuanca	5	1	2,5
5. Chipipata	5	0	0
6. Huaylashjirca	5	0	0
7. Lucmapampa	5	0	0
8. Yanacocha	5	0	0
Total	40	7	17,5

En la figura 10 se aprecia que en la localidad de Chinche se obtuvo mayor porcentaje de muestras positivas (nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis*), mientras que Chipipata, Huaylashjirca, Lucmapampa y Yanacocha no se registraron nematodos entomopatógenos.

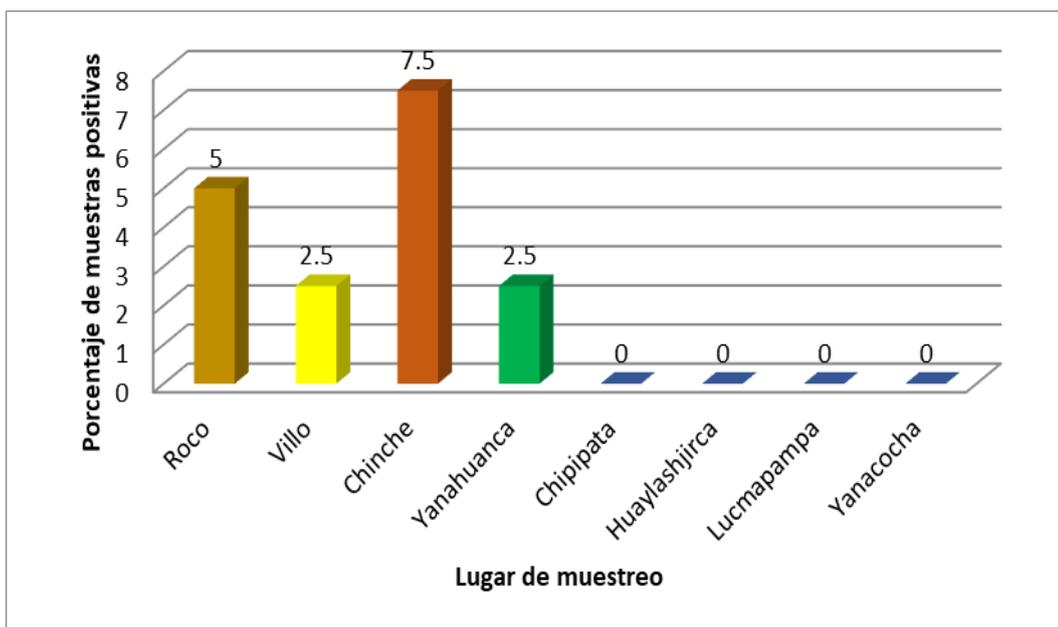


Fig. 10 Porcentaje de muestras positivas según localidad de muestreo en el distrito de Yanahuanca.

4.2.2 Presencia de nematodos entomopatógenos a diferentes altitudes y en diferentes cultivos

En la figura 11 la presencia de nematodos en función de la altitud se pudo observar que existe una mayor cantidad de muestras con nematodos entomopatógenos a una menor altitud de 3323 a 3396 msnm con un 71,5 % (5/7), le sigue en importancia la altitud de 3413 a 3480 msnm con un 28,5 % (2/7).

La presencia de *Heterorhabditis* se registró con mayor incidencia a los 3480 msnm localidad de Chinche con 8,4 % y la menor incidencia fue a los 3396 msnm localidad de Roco con 2,3 %

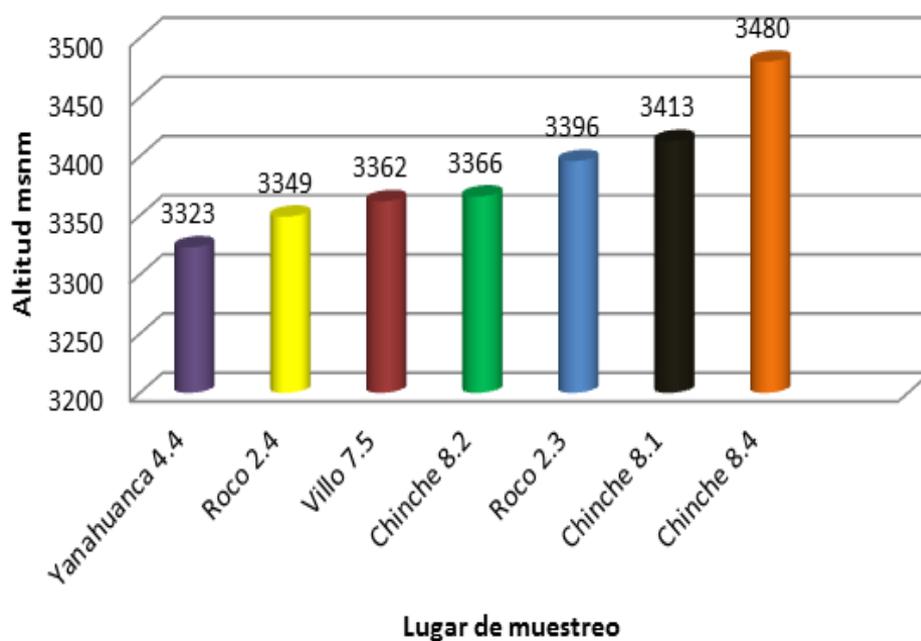


Fig. 111 Porcentaje de Heterorhabditis en función a la altitud en el distrito de Yanahuanca.

En general se puede afirmar que la temperatura, HR, y Pp no influye en la presencia de los nematodos entomopatógenos, ya que se observó nematodos en altitudes mayores a 3323 msnm Yanahuanca, tal como se observa en el cuadro 3

Cuadro 3. Datos meteorológicos de los meses de agosto y setiembre

	Agosto			Setiembre		
	T°	HR	Pp	T°	HR	Pp
Máxima	26	88%	00	24	76.73	42.35
Mínima	5			6		
Promedio	14.5			14.8		

Fuente: MINAG, Agencia agraria Yanahuanca.

Cuadro 4 Nematodos entomopatógenos registrados en función de cultivos y descanso (campo en barbecho)

Distrito	Lugar de Colecta	Punto de Muestreo	Cultivos	Género registrado
Yanahuanca	Roco	Punto 2.3	Alfalfa	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Roco	Punto 2.4	Maíz	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Villo	Punto 7.5	Maíz	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Yanahuanca	Punto 4.4	Papa	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.1	Forestal	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.2	Cebolla	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.4	Descanso	<i>Heterorhabditis</i>

En el cuadro 4 se muestra que, en el distrito de Yanahuanca, en los lugares de colecta y punto de muestreo en los cultivos de alfalfa, maíz, papa, cebolla, forestal y campo en descanso se registró el género *Heterorhabditis*.

En la figura 12 se puede apreciar el número de muestras positivas con presencia de nematodos del género *Heterorhabditis*, donde el cultivo de maíz presentó 28.6 %, seguido de los cultivos alfalfa, papa, forestal, cebolla y descanso (campo en barbecho) con 14.3 %

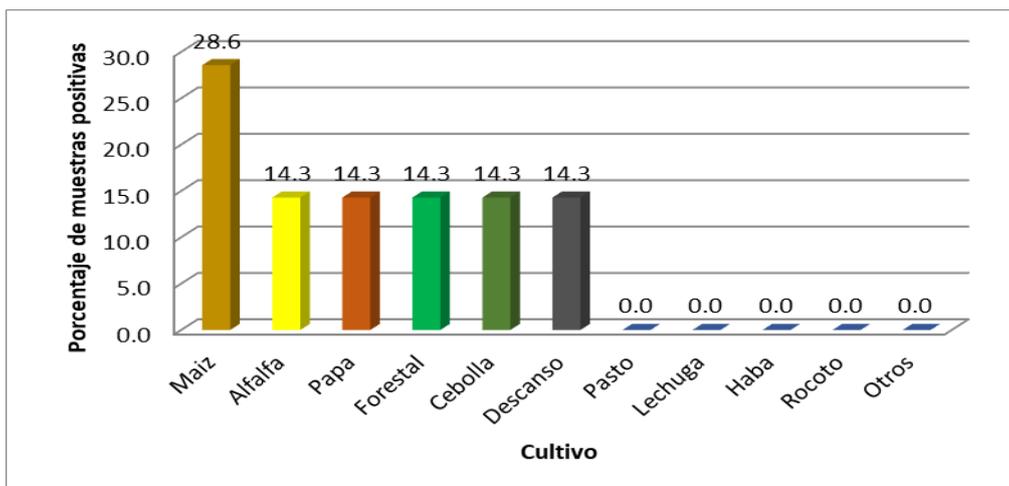


Fig. 122 Porcentaje de muestras positivas con *Heterorhabditis* en función de cultivos y descanso (campo en barbecho).

4.2.3 Nematodos entomopatógenos encontrados en diferentes tipos de suelos en el distrito de Yanahuanca

En el cuadro 5 se aprecia que, de los lugares muestreados en el distrito de Yanahuanca, el pH fue de 7.09 hasta 8.25 es decir de neutro a ligeramente alcalino, encontrándose y predominando el género *Heterorhabditis*.

Cuadro 5 Nematodo entomopatógeno registrado en función del pH del suelo.

Distrito	Lugar de Colecta	Punto de Muestreo	pH	Género registrado
			(1:1)	
Yanahuanca	Roco	Punto 2.3	7.56	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Roco	Punto 2.4	7.09	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Villo	Punto 7.5	8.25	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Yanahuanca	Punto 4.4	7.98	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.1	7.67	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.2	7.31	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.4	7.63	<i>Heterorhabditis</i>

En el cuadro 6 se aprecia que, de los lugares muestreados en el distrito de Yanahuanca, la materia orgánica fue de 2,1 % hasta 5,3 % es decir categoría medio (Rocco punto 2.3 y 2.4; Villo punto 7.5) y categoría alto (Yanahuanca punto 4.4 y Chinche punto 8.1, 8.2 y 8.4) encontrándose y predominando el género *Heterorhabditis*.

Cuadro 6 Nematodos entomopatógenos registrados en función de la materia orgánica.

Distrito	Lugar de Colecta	Punto de Muestreo	Materia Orgánica	Género registrado
			%	
Yanahuanca	Roco	Punto 2.3	2,1	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Roco	Punto 2.4	2,2	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Villo	Punto 7.5	2,3	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Yanahuanca	Punto 4.4	3,9	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.1	4,8	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.2	5,3	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.4	5,2	<i>Heterorhabditis</i>

En la figura 13 se muestra que el genero *Heterorhabditis* se encuentra presente en los tipos de textura Franco Arcillo Arenoso, Franco Arenoso y Franco Arcilloso, registrando muestras positivas con 42.9 % (Fr.Ar.A) en el punto 2.3 de Roco, el punto 4.4 de Yanahuanca y el punto 8.2 de Chinche; siguiendo con el 42.9 % (Fr.A.) en el punto 2.4 de Roco, el punto 7.5 de Villo y el punto 8.4 de Chinche; siendo el ultimo con 14.2 % (Fr.Ar.) en el punto 8.1 de Chinche.

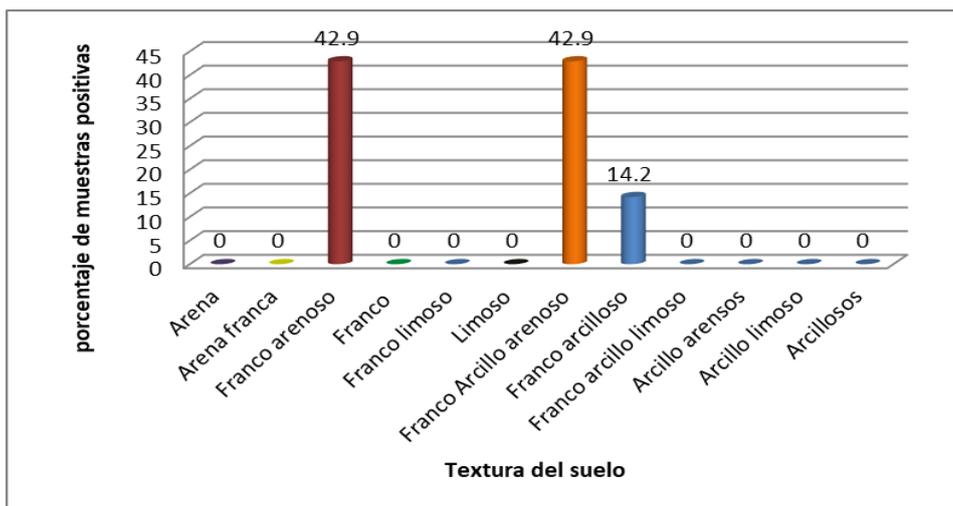


Fig. 13 Muestras positivas en función de la clase textural del suelo

En el cuadro 7 se aprecia que, de los lugares muestreados en el distrito de Yanahuanca, en la clase textural franco arcillo arenoso y franco arenoso se registró el género *Heterorhabditis*. Debido a que este género puede dispersarse en suelos con textura ligera donde los poros son menos que el ancho del cuerpo.

Cuadro 7 Nematodos entomopatógenos registrados en función a la clase textural del suelo.

Distrito	Lugar de Colecta	Punto de Muestreo	Clase Textural	Género registrado
Yanahuanca	Roco	Punto 2.3	Fr.Ar.A.	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Roco	Punto 2.4	Fr.A.	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Villo	Punto 7.5	Fr.A.	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Yanahuanca	Punto 4.4	Fr.Ar.A	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.1	Fr.Ar.	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.2	Fr.Ar.A.	<i>Heterorhabditis</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.4	Fr.A.	<i>Heterorhabditis</i>

4.3 Prueba de hipótesis

La hipótesis planteada en la investigación se confirma debido a que durante la investigación desarrollada se encontraron nematos entomopatógenos en la provincia Daniel Alcides Carrión.

4.4 Discusión de los resultados

4.4.1 Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos.

Con el propósito de caracterizar el género de nematodo entomopatógeno aislados en el distrito de Yanahuanca, los nematodos fueron identificados como pertenecientes al género *Heterorhabditis* basándose en la sintomatología por los cambios característicos en el color de los cadáveres debido a la bacteria simbiote, el patrón de desarrollo típico en la emergencia de juveniles infectivos o incubación prolongada. De los aislados recuperados, todos fueron *Heterorhabditis*. Morfológicamente fue distinguible algunas características de los juveniles infectivos de tercer estadio se encontraban dentro de la cutícula del segundo estadio, los cuales mostraron un número de anillos longitudinales ligeramente visibles. La cabeza presento una proyección pequeña en la porción dorsal y el poro excretor localizado posteriormente al anillo nervioso. Estos caracteres indican que este aislado fue del género *Heterorhabditis*.

4.4.2 Presencia de nematodos entomopatógenos a diferentes altitudes y en diferentes cultivos

En general la mayoría de *Heterorhabditis* fueron recuperados de zonas cálidas, con temperaturas que varían entre 18 °C y 9 °C. Aunque también se logró obtener

Heterorhabditis en uno de los puntos más fríos Chinche 8.4 con 3480 msnm cuyo promedio varía entre 15 °C y 3.5 °C. Los resultados de esta inspección demuestran que todos los nematodos aislados fueron del género *Heterorhabditis*, con tendencias semejantes a las reportadas en previas investigaciones y recientemente, lo que sugieren que las diferencias en la supervivencia de los nematodos a diferentes temperaturas, puede reflejar en parte, su hábitat climático original (Molineux, 1985).

4.4.3 Nematodos entomopatógenos encontrados en diferentes tipos de suelos en el distrito de Yanahuanca

Estos resultados muestran que el pH es un factor importante de la distribución de este género, así como un indicador de la composición del suelo. Lo cual concuerda con lo mencionado por (Kaya, 1990) donde indica que los nematodos entomopatógenos pueden desarrollarse en cualquier pH del suelo. Así mismo podemos indicar que cuando el contenido de materia orgánica es de medio a alto se da la presencia de nematodos. Suelos con texturas pesadas como la alta presencia de arcilla y limo dificultan su dispersión y pueden restringir la migración de los nematodos (Ames y Smart, 1989)

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que:

De un total de 40 muestras recolectadas en el distrito de Yanahuanca, al ser evaluadas en el laboratorio del CIP se identificó solamente al género *Heterorhabditis*

De las muestras de suelo obtenidas a distintas altitudes en el distrito de Yanahuanca en sistemas agrícolas, pastizales y vegetación natural, entre los 2979 a 3658 msnm, se identificó al género *Heterorhabditis*

La presencia de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* se encontraron en suelos Franco arcillo arenoso, francos arenosos y francos arcillosos, con contenido de materia orgánica entre 2.1 y 5.2 % y pH entre 7.09 y 8.25.

De acuerdo con la sintomatología en larvas de *G. mellonella*, los 7 aislamientos obtenidos de las muestras pertenecen al género *Heterorhabditis*

RECOMENDACIONES

Realizar identificación y clasificación taxonómica del aislamiento de nematodo entomopatógeno aislado, debido a que en la presente investigación solo se llegó a identificar el género.

Establecer procedimientos y metodologías de multiplicación del nematodo entomopatógeno a gran escala.

Establecer ensayos en invernadero y campo con los nematodos del género *Heterorhabditis* aislados en el distrito de Yanahuanca, para determinar su efectividad en el control de insectos plagas.

Deben intensificarse más los estudios sobre nematodos entomopatógenos en el marco de una agricultura ecológicamente competitiva, sostenible en el tiempo y que ofrezca productos de alta calidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agüera, M. & Laumond, C. 1994.** Uso de nemátodos entomopatógenos a campo. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 279-292
2. **Akhurst, R. J. 1982** Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.* 128: 3061-3065.
3. **Akhurst, R. J. 1990.** Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In “Safety of Microbial Insecticides” (M. Laird, L.A. Lacey, and E.W. Davidsons, Eds.) pp. 233-240. CRC Press. Boca Raton, FL.
4. **Akhurst, R. J. 1990.** Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In “Safety of Microbial Insecticides” (M. Laird, L.A. Lacey, and E.W. Davidsons, Eds.) pp. 233-240. CRC Press. Boca Raton, FL.
5. **Akhurst, R. J. & Bedding, R. A. 1978.** A simple cross-breeding technique to facilitate species determination in the genus *Neoplectana*. *Nematologica* (3): 328-330

6. **Akhurst, R. J. & Brooks, W. M. 1984.** The distribution of entomophilic nematodes Heterorhabditidae and Steinernematidae in north Carolina. J. Invertebr. Pathol. 44: 140-145.
7. **Akhurst, R. J. & Bedding, R. A. 1986.** Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in soil in Australia. J. Aust. Entomol. Soc. 25: 241-244.
8. **Akhurst, R. J. & Bedding, R. A. & Bull, R. M. & Smith, D. R. 1992.** An epizootic of *Heterorbaditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane Scarabaeidae (Coleoptera). Fundamental and Applied Nematology, 15, 71-73.
9. **Akhurst, R. J., & Dunphy, G. B. 1993.** Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In "Parasites and Pathogens of insects". (N.E. Bedkage., S. N. Thompson., and B.A., Federici., Eds.). pp. 1-23. Academic Press, New York.
10. **Alcázar, J. & Cañedo, V. 2003** Control biológico de plagas (mimeografiado).
11. **Ames, L. M. & Smart, G. C. Jr. 1989.** Migration of an entomogenous nematode, *Steinernema* n. sp., through selected Florida soils. J. Nematol. 21: 550.

12. **Barbercheck, M. E 1992.** Effects of Soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. Florida Entomologist, 75 (4), 539-548.
13. **Beeding, R. A & Akhuerst, R. J. 1975.** A simple technique for the detection of insect parasite rhabditid nematodes in soil nematologica. 21. 109-110.
14. **Boemare N. 2002.** Biology, taxonomy and systematics of Photorhabdus and Xenorhabdus. In: Gaugler R. ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. Wallingford, UK; pp. 35-56
15. **Brady, N. C. 1974.** The nature and properties of soils. New York: Macmillan.
16. **CAB International. 2005.** Crop protection compendium.
17. **Cepeda, M. 1996.** Nematología Agrícola. Editorial Trillas. México
18. **Dunphy, G. B & Thurston, G. S. 1990.** Insect immunity in entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, FL.

19. **Downes, M. J. & Griffin, C. T. 1996.** Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 347-356.

20. **Evans, A. A. F. & Perry, R. N. 1976.** Survival strategies in nematodes. In Crool, N.A. (Ed.), *The organization of Nematodes* pp. 383-401. London: Academic Press.

21. **Fischer-Le Saux, M. & Viallard, V. & Brunel, B. & Normand, P. & Boemare, N. E. 1999.** Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov. *P. temperate* sp. nov., *P. temperate* subsp. *temperate*. Nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *inter. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1645-1656.

22. **Gaugler, R. 1988.** Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agric. Ecosys. Environ.* 24: 351-360.

23. **Georgis, R. 1992.** Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 83-99.

24. **Garzon, M. & Aza, B. & Jiménez, J.; & Luque, J. 1996.** Potencial del Nematodo *Steinernema* sp. Para el control biológico del gusano blanco de papa. Revista Colombiana de Entomología. Vol. 22 N° 1 pp. 25-30
25. **Glazer, I. 1996.** Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. Biocontrol science and Technology, 6, 373-378.
26. **Georgis, R., & Manweiler, S. A. 1994.** Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. Agricultural Zoology Review. En K. Evans (Ed.) Department Entomology and Nematology. (AFRC Institute of Arable Crops Research, Rothamsted Experimental Station, Harpenden Herts, UK. Vol. 6, 63-94).
27. **Georgis, R., y Poinar, G. O. Jr. 1983.** Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Nematology, 15, 308-312.
28. **Georgis, R., y Hague, N. G. M. 1991.** Nematodes as biological insecticides. Pesticide Outlook, 2, 29-32.
29. **Georgis, R. & Gaugler, R. 1991.** Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology, 84, 713-720.

30. **Gaugler, R., y Boush, G. M. 1978.** Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*. Journal of Invertebrate Pathology, 32, 291-296.
31. **Griffin, C. T. & Downes, M. J. 1991.** Recognition of low-temperature isolates of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). Nematologica, 40, 106-115.
32. **Hazir, S. & Stock, S. P. & Keskin, N. 2003.** A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n.sp (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. Syst. Parasitol, 55 (3): 211-220.
33. **Hominick W. M. & Briscoe, B. R. & Del Pino, F. G. & Heng, J. & Hunt, D. J. & Kozodoi, E. & Mracek, Z. & Nguyen, K. B. & Reid, A. P. & Spiridonov, S. & Stock, S. P. & Sturhan, D. & Waturu, C. & Yoshida, M. 1997.** Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. Journal of Helminthology. 71, 271-298
34. **IINAP. 2004** Identificación de Nematodos Entomopatógenicos en las Familias Steinernematidae y heterorhabditidae. Ed. Sur Real Estudios. Ecuador

35. **Kaya, H. K. 1990.** Soil ecology. In “Entomopathogenic Nematodes in Biological Control-1990” (R. Gaugler and H.K. Kaya, Eds.). pp 93-115. CRC press, Boca Raton, Florida
36. **Kaya, H. & Stock. S. P. 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.
37. **Kaya, H. K., y Gaugler, R. 1990.** Entomopathogenic nematodes in Biological control. Boca Raton, Fl. CRC Press.
38. **Kaya, H. K., y Gaugler, R. 1993.** Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology, 38, 181-206.
39. **Kaya, H. K., y Nelsen, 1985.** Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. Environmental Entomology, 14, 572-574.
40. **Kaya, H. K., y Thurston, G. 1993.** Soil microorganisms affecting entomopathogenic nematodes, En R.A. Beeding R.J. Akhurst y H.K. Kaya (Eds.), Nematodes and the biological control of insect pests (pp. 97-104). East Melbourne, Australia: CSIRO Publications.

41. **Kaya, H. K., Bedding, R. A., y Akhurst, R. J. 1993.** An overview of insect parasitic nematodes. En R.A. Bedding R.J. Akhurst y H.K. Kaya (Eds.), Nematodes and the biological control of insect pest (pp. 1-10). East Melbourne, Australia: CSIRO Publications.
42. **Kaya, H. K. & and Hara, A. H. 1981.** Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *J. Nematol.* 13 (3), 91-294.
43. **Kamionek, M. & Sandner, H. & Seryczynska, H. 1974.** The combined action of *Beauveria bassiana* (Bls/Vuill) (Fungi imperfecti: Moniliales) and *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Nematoda: Steinernematidae). *Bull. I'Acad. Polonaise Sci.* 22:253-257.
44. **Klein, M. G. 1990.** Efficacy against soil-inhabiting insects pest. Pp 195-214. Boca Raton, FL. CRC Press.
45. **Koppenhofer, A. M. 2000.** Nematode. En: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. Pg. 293-301.

46. **Koppenhofer, A. M. & Kaya, H. K. & Taormino, S. 1995.** Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *J. Invertebr. Pathol.* 65:193-199.
47. **Kung, S. P. & Gaugler, R. & Kaya, H. K. 1990** Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematodes persistence. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 242-249.
48. **Lacey, L. A. & Bettencourt, R. & Garret, F. J. & Simones, N. J. y Gaugler, R. 1993.** Factors influencing parasitism of adult Japanese beetles, *Popilia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) by entomopathogenic nematodes. *Entomophaga*, 38 (4), 501-509.
49. **Lewis, E. E., Gaugler, R., y Harrison, R. 1993.** Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. J. Zool.* 71: 765-769.
50. **Lewis, L. C. & Raun, E. S. 1978.** Laboratory and field evaluation of the DD-136 strain of *Neoplectana carpocapsae* for control of the European corn borer, *Ostrina nubilalis*. *Iowa State Journal Research* 52, 391-396.

51. **Lysenko, O & Weiser, J. 1974.** Bacteria associated with the nematode *Neoplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 332-336.
52. **Molyneux, A. S. 1986.** *Heterorhabditis* spp. And *Steinernema* spp. Temperature and aspects of behavior and infectivity. *Experiental Parasitology*, 62 169-180.
53. **Poinar, G. O, Jr. 1989.** Non-insect host for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev. Nematol.* 12(4): 423-428.
54. **Poinar, G. O., Jr. 1979.** Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.
55. **Poinar, G. O. 1990.** Biology and Taxonomy. En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control-1990*. Press, Boca Raton, FL.
56. **Poinar, G. O. Jr. 1990.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En R. Gaugler y H.K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological* (pp. 23-61). Boca Raton, FL.: CRC Press.

57. **Poinar, G. O. 1990.** Biology and Taxonomy. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological control-1990. (R.R. Gaugler and H.K.Kaya.Eds.). pp. CRC. Press, Boca Raton, FL.
58. **Richardson P. N. & Grewal P. S. 1994.** Entomopathogenic nematodes and the soil environment. Ecology and biology of soil organisms. Bhandari S.C., Somani L.L. (eds). P. 105.130. Agrotech Publishing Academy. Udaipur, India.
59. **Sayre, R. M. & Starr, M. P. 1988.** Bacterial disease and antagonisms of nematodes. In: Diseases of Nematodes, Vol. 1 (G.O. Poinar, jr. and H.B. Janssons, Eds) 69-101. CRC Press, Boca Raton, Florida.
60. **Stock, P. y Camino, N. 1992.** Nemátodos Entomopatógenos. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina. 105-117.
61. **Stock, S. P. 1995.** Natural populations of entomopathogenicnematodes in the pampean región Argentina. Nematropica. 25: 143-148.
62. **Schmidt, J. y All, J.N. 1979.** Atraction of Neoplectana carpocapsae to common excretory products of insects. Enviromental Entomology 7: 604-607.

63. **Forschler, B. T., All, J. N., y Gardner, W. A. (1990).** *Steinernema feltiae* activity and infectivity response to herbicide exposure in aqueous and soil environmental. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 343-347.
64. **Simons, W. R. 1973.** Nematode survival in relation to soil moisture. *Medd. Landbouwhogeschool Wageningen*. 73: 1-75.
65. **Timper, P. & Kaya, H. K. & Gaugler, R. 1988.** Dispersal of the entomopathogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidia: Steinernematidae) by infected adult insects. *Environ. Entomol.* 17 (3): 546-550.
66. **Municipalidad del Distrito de Yanahuanca. 2014.**
http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/municipalidades/882/.
67. **Wallace, H. R. 1971.** Abiotic influences in the soil environment. En B.M. Zuckerman, W.F. Mai y R.A. Rhode (Eds), *Plant Parasitic Nematodes Vol 1*. Pp 257-280. New York: Academic Press.
68. **Womersley, C. Z. 1990.** Dehydration y anhydrobiotic potential. En R. Gaugler y H.K. Kaya (Eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control* pp. 117-137. Boca Raton Florida.

69. **Zimmerman, E. C. 1978.** Insect of hawaii. Vol. 9, Microlepidoptera.
University of Hawaii press: Honolulu, Hawaii, USA.

ANEXO

Anexo 1 Cuadros

Cuadro 8. Tarjeta de identificación y caracterización de las muestras de suelo

TARJETA DE IDENTIFICACION:	
FECHA:	
HABITAT:	
LUGAR GENERAL:	
LOCALIZACIÓN DEL LUGAR (Barrio, Paraje...):	
ALTITUD:	
LONGITUD:	
LATITUD:	
KM:	
MUESTRA GENERAL / PUNTO:	
MUESTRA Nro:	
TEMPERATURA:	
VEGETACIÓN/CULTIVO:	
PRESENCIA INSECTOS:	
COLECTOR:	
OBSERVACIONES:	

Cuadro 9. Porcentaje de muestras positivas según localidad de muestreo

	LOCALIDADES	%	MUESTRA POSITIVA	TOTAL DE MUESTRAS
1	Roco	5	2	5
2	Villo	2.5	1	5
2	Chinche	7.5	3	5
4	Yanahuanca	2.5	1	5
5	Chikipata	0	0	5
6	Huaylashjirca	0	0	5
7	Lucmapampa	0	0	5
8	Yanacocha	0	0	5
				40

Cuadro 10. Cultivos donde se presentó el nematodo Heterorhabditis

	CULTIVO	%	CANTIDAD
1	Maiz	28.6	2
2	Alfalfa	14.3	1
2	Papa	14.3	1
4	Forestal	14.3	1
5	Cebolla	14.3	1
6	Descanso	14.3	1
7	Pasto	0.0	0
8	Lechuga	0.0	0
	Haba	0.0	0
	Rocoto	0.0	0
	Otros	0.0	0
	Total	100.0	7

Cuadro 11. Muestras por localidad según su pH

Localidad		pH
2	Villo 7.5	8.25
4	Yanahuanca 4.4	7.98
5	Chinche 8.1	7.67
7	Chinche 8.4	7.63
1	Roco 2.3	7.56
6	Chinche 8.2	7.13
2	Roco 2.4	7.09

Cuadro 12. Porcentaje de Materia Orgánica por Localidad

LOCALIDAD		% DE M. O
6	Chinche 8.2	5.3
7	Chinche 8.4	5.2
5	Chinche 8.1	4.8
4	Yanahuanca 4.4	3.9
2	Villo 7.5	2.3
2	Roco 2.4	2.2
1	Roco 2.3	2.1

Cuadro 13 Características físico-químicas del suelo: pH, Materia Orgánica, Fosforo, Potasio, Calcio de los lugares que resultaron positivas y según cultivo con la presencia de nematodos entomopatógenos.

Distrito	Lugar de Colecta	Punto de Muestreo	Cultivo	Análisis químico					Análisis Mecánico				Género de Nematodo encontrado
				pH (1:1)	CaCO3 %	MO %	P ppm	K Ppm	Arena %	Limo %	Arcilla %	Clase Textural	
Yanahuanca	Roco	Punto 2.3	Alfalfa	7.56	13.28	2.1	8.8	435	50	22	28	Fr.Ar.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Roco	Punto 2.4	Maíz	7.09	11.38	2.2	4.1	110	58	24	18	Fr.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Villo	Punto 7.5	Maíz	8.25	7.2	2.3	4.1	125	64	17	19	Fr.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Yanahuanca	Punto 4.4	Papa	7.98	15.38	3.9	11.7	1008	48	26	26	Fr.Ar.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.1	Forestal	7.67	7.11	4.8	11.7	482	44	28	28	Fr. Ar.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.2	Cebolla	7.31	7.13	5.3	10.2	540	51	23	27	Fr.Ar.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>
Yanahuanca	Chinche	Punto 8.4	Descanso	7.63	8.21	5.2	9.6	498	58	23	20	Fr.A.	<i>Heterorhabditis sp</i>

Anexo 2 Fotografías



Figura14. *Galleria mellonella* infectadas con nematodos



Figura 15 Larvas infectadas con nematodos.



Figura 16. Almacenamiento de los nematodos



Figura 17. Nematodo observado con el microscopio.