

Efecto de temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento en la supervivencia de nemátodos entomopatógenos

Effect of temperature, concentration and storage time on the survival of entomopathogenic nematodes

JUAN PABLO MOLINA ACEVEDO¹, ALCIDES MOINO JR², RICARDO SOUSA CAVALCANTI²,
VANESSA ANDALÓ², LÚCIA APARECIDA MENDONÇA²

Resumen. Los nemátodos entomopatógenos (NEP) son agentes potenciales para control de plagas agrícolas. Estudios para mejorar su supervivencia y patogenicidad en condiciones de almacenamiento son necesarios, donde factores como temperatura, concentración y tiempo determinan su viabilidad. En este experimento se determinó el porcentaje de supervivencia de nemátodos (PSN) en almacenamiento, de seis especies de NEP, tres steinernemátidos (Rhabditida: Steinernematidae): *Steinernema carpocapsae* (Weiser), *S. glaseri* (Steiner) and *S. arenarium* (Artyukhovsky), y tres heterorhabdítidos: (Rhabditida: Heterorhabditidae) *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), *H. bacteriophora* HP88 (Grenier) y *H. baujardi* LPP7 (Dolinski), en cinco temperaturas (8, 12, 16, 20 y 24°C), dos concentraciones (1000 y 10000 IJ/mL) y dos tiempos (15 días y 3 meses). El diseño experimental fue parcelas subdivididas en el tiempo, con diseño factorial 6 x 2 en la parcela en dos tiempos, respectivamente, donde cada tratamiento contó con 10 repeticiones. En la supervivencia de todos los NEP, la interacción triple entre temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento fue significativa ($P < 0,05$). En la mayoría de los steinernemátidos el PSN aumentó gradualmente en un rango amplio de temperatura desde 8 hasta 20°C, en ambas concentraciones y en el menor tiempo, registrándose supervivencia entre 87 y 95%. Por el contrario temperaturas altas 20 y 24°C, junto con la menor concentración y tiempo, favorecieron la alta supervivencia de heterorhabdítidos estando entre 78 a 92% respectivamente. Así en este experimento se lograron determinar condiciones específicas para cada NEP, lo cual representa una alta supervivencia, para su uso en programas de control biológico y preservación con alta viabilidad en laboratorio.

Palabras clave: Factores abióticos, entomonemátodos, viabilidad, insecto plaga, control biológico.

Abstract. Entomopathogenic nematodes (EPN) are potential agents for the control of agricultural pests. Studies to improve their survival and pathogenicity under storage conditions are necessary where factors like temperature, concentration and time determine their viability. In this experiment the percent survival of nematodes (PSN) in storage was determined for six species of EPN, three steinernematids (Rhabditida: Steinernematidae): *Steinernema carpocapsae* (Weiser), *S. glaseri* (Steiner) and *S. arenarium* (Artyukhovsky), and three heterorhabditids: (Rhabditida: Heterorhabditidae) *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), *H. bacteriophora* HP88 (Grenier) and *H. baujardi* LPP7 (Dolinski), at five temperatures (8, 12, 16, 20, and 24°C), two concentrations (1000 and 10000 IJ/mL) and two times (15 days and 3 months). The experimental design was plots subdivided by time, with a 6 x 2 factorial design in the plot over two times, respectively, where each treatment had 10 replications. In the survival of all EPN, the three-way interaction among temperature, concentration and storage time was significant ($P < 0,05$). In most of the steinernematids the PSN gradually increased in a wide range of temperature from 8 to 20°C, in both concentrations and in the shortest time, registering survival between 87 and 95%. On the contrary, high temperatures of 20 and 24°C, together with the low concentration and shortest time, favored a high survival of heterorhabditids, being between 78 and 92%, respectively. In this experiment it was possible to determine the specific conditions for each EPN that represent a high survival, for their use in programs of biological control and preservation with high viability in the laboratory.

Key words: Abiotic factors, entomonematodes, viability, insect pest, biological control.

Introducción

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) son organismos no segmentados e invertibrados pertenecientes al Phylum

Nematoda los cuales han establecido coevolutivamente un parasitismo obligado con insectos (Kaya y Stock 1997). En las últimas décadas los NEP han cobrado

importancia, como agentes para el control de plagas, ante las actuales restricciones por el uso de insecticidas, constituyéndose como una herramienta efectiva

1 Doctorando, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), CCTA/Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: juanpamolina@yahoo.com.br

2 Universidade Federal de Lavras. Departamento de Entomologia, C.P.37, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

para incorporar en programas MIP (Ehlers 1996). De acuerdo con Molina y López (2003) los NEP presentan alta potencialidad para control de plagas del suelo y de hábitos crípticos como *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae); sin embargo, factores abióticos como la humedad pueden disminuir su eficiencia. Así mismo varios factores afectan también la supervivencia del juvenil infectante (JI) como son la radiación ultravioleta, la textura del suelo, el pH y la temperatura extremas en campo (Georgis y Manweiler 1994). En general la actividad térmica en campo de NEP steinernemátidos se encuentra entre 3 e 14°C y para heterorhabditidos, entre 10 e 16°C (Molineux 1985). Temperaturas sobre 30°C o bajo 0°C afectan negativamente la persistencia de NEP, pero depende de las especies de NEP y la región geográfica de origen (Smits 1996). Por otra parte, Kaya y Stock (1997) afirman que casi todas las especies de NEP son activas a temperatura ambiente (25±2°C) y en condiciones de almacenamiento nemátodos steinernemátidos se conservan mejor a temperaturas entre 8 a 15°C, sobreviviendo de 6 a 9 meses; nemátodos heterorhabditidos sobre las mismas condiciones, sobreviven por 3 a 4 meses. Con respecto a concentración de NEPs en almacenamiento afirman que bajas concentraciones entre 1000 a 2000 JI/mL son ideales. Así el objetivo de este trabajo fue establecer cuál temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento favorecen la supervivencia y patogenicidad de diferentes especies NEP usadas convencionalmente en control biológico.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Patología de Insectos del Departamento de Entomología de la Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada en la ciudad de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil.

Material biológico. Se utilizaron algunas de las especies más usadas de NEP en control biológico como *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. glaseri* (Steiner, 1929) y *S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) suministradas por la Dra. Marineide Aguilera de la Universidade Federal de São Carlos (UFScar) en Araras-São Paulo-Brasil y las especies *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1955), *H. bacteriophora* cepa HP88 (Grenier *et al.* 1996) y *H. baujardi* cepa LPP7 (Dolinski 2004) fueron suministradas por la Dra Claudia Dolinski de la Universidade Estadual do Norte Fluminense (UNEF) en Campos-Rio de Janeiro-Brasil. Todas estas especies de NEP estaban almacenadas en nevera a una temperatura de 8±2°C (Fig. 1A). Para la reactivación de los NEP se dejaron aclimatar y reactivar durante 24 horas a una temperatura ambiente de 25 ± 2°C (Fig. 1B).

Producción de JI para el bioensayo. Los JI se multiplicaron y activaron de acuerdo con la metodología descrita por Molina y López (2001); se infectaron larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), con un promedio de peso de 0,20 ± 0,018g, obtenidas de la cría del laboratorio de patología de insectos de la UFLA. Cinco larvas se colocaron en una caja de Petri con papel filtro (Diámetro=9cm) y fueron inoculadas con 100 JI de NEP mediante el sistema de infección tópica (Fig. 1C). Este procedimiento se realizó por cada especie de NEP. Las placas de Petri se llevaron a incubación a 25±2°C y se colocaron en cámara seca (caja de Petri con papel filtro) solo las larvas que presentaron sintomatología de infección (Fig. 1D). Así para steinernemátidos y heterorhabditidos la sintomatología típica son colores pardos y rojizos en la cutícula de las larvas respectivamente; entre 5 y 10 días después se colocaron radialmente las larvas en trampas White (White 1927) humedecidas con 5 mL de agua destilada (AD) (Figs. 1E-F) para obtener la nueva generación de JI emergiendo masivamente de larvas de *G. mellonella* (Fig. 1G), los cuales se emplearon para el experimento.

Desinfección superficial y ajuste de concentraciones de JI. En probetas de 1L se colocaron 800mL de agua destilada estéril (ADE) con hipoclorito de sodio al 0,05%. Por cada especie de nemátodos en alta concentración, se agregaron a las probetas 100 mL de AD con JI que estaban en las trampas White. Durante 12 horas a temperatura ambiente (tiempo y temperatura de acondicionamiento) se dejaron decantando los JI para de esta forma ser limpiados a medida que descienden por la probeta hasta reposar en el fondo. Posteriormente se recogieron los JI en aproximadamente 100 mL de AD, siendo transferidos a erlenmeyers de 500mL, con 100 mL de ADE con hipoclorito al 0,05% para desinfección y se verificó que los JI estuvieran vivos y activos (Fig. 1). Posteriormente por cada especie de NEP, se tomo una alícuota de 1mL y mediante una cámara de conteo de nemátodos (Fig. 1H) se ajustó a las

concentraciones evaluadas de 1000 JI/mL y 10000 JI/mL.

Evaluación de temperatura y concentración para el almacenamiento de nemátodos. Suspensiones ajustadas con los nemátodos *Steinernema carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. arenarium*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. bacteriophora* cepa HP88 y *H. baujardi* cepa LPP7 en las concentraciones de 1000 y 10000 JI/mL, se colocaron en 25 mL de AD en vasos plásticos (110 mL de capacidad) protegidos con papel aluminio con perforaciones para permitir la oxigenación (Fig. 1J).

Los vasos con las diferentes especies y concentraciones de nemátodos fueron colocados a diferentes temperaturas (8, 12, 16, 20 y 24°C), en incubadoras con fotoperiodo de 12 horas (Fig. 1K). Las evaluaciones se hicieron en dos tiempos (15 días y 3 meses) al termino de los cuales se agitó cada vaso con los JI y se tomó una alícuota de 100uL en la cámara de conteo de nemátodos agregándose 900uL hasta completar 1mL y contar JI vivos y muertos. Este procedimiento se repitió cuatro veces por muestra para obtener un promedio. De esta forma se estimó la variable porcentaje de supervivencia de los nemátodos (PSN):

$$PSN = \left(\frac{JI \text{ vivos}}{JI \text{ muertos}} \right) \times 100$$

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño enteramente aleatorio, en parcelas subdivididas en el tiempo (días y meses), en esquema factorial 6 x 2 en la parcela (los factores fueron seis especies de nemátodos y dos concentraciones evaluados en dos tiempos). Cada tratamiento contó con nueve repeticiones (vasos). Para la variable porcentaje de supervivencia de nemátodos, se realizó un análisis de variancia. Los promedios de JI producto de las temperaturas y concentraciones de NEP en los dos tiempos se compararon a través de la prueba Scott-Knott al 5% de significancia. Para cada especie de NEP se estimaron las ecuaciones de regresión ajustadas a diferentes modelos matemáticos de acuerdo con el coeficiente de correlación R².

Resultados y Discusión

Supervivencia de nemátodos. Se encontró para la variable porcentaje de supervivencia, que la interacción triple entre los factores temperatura, concentración

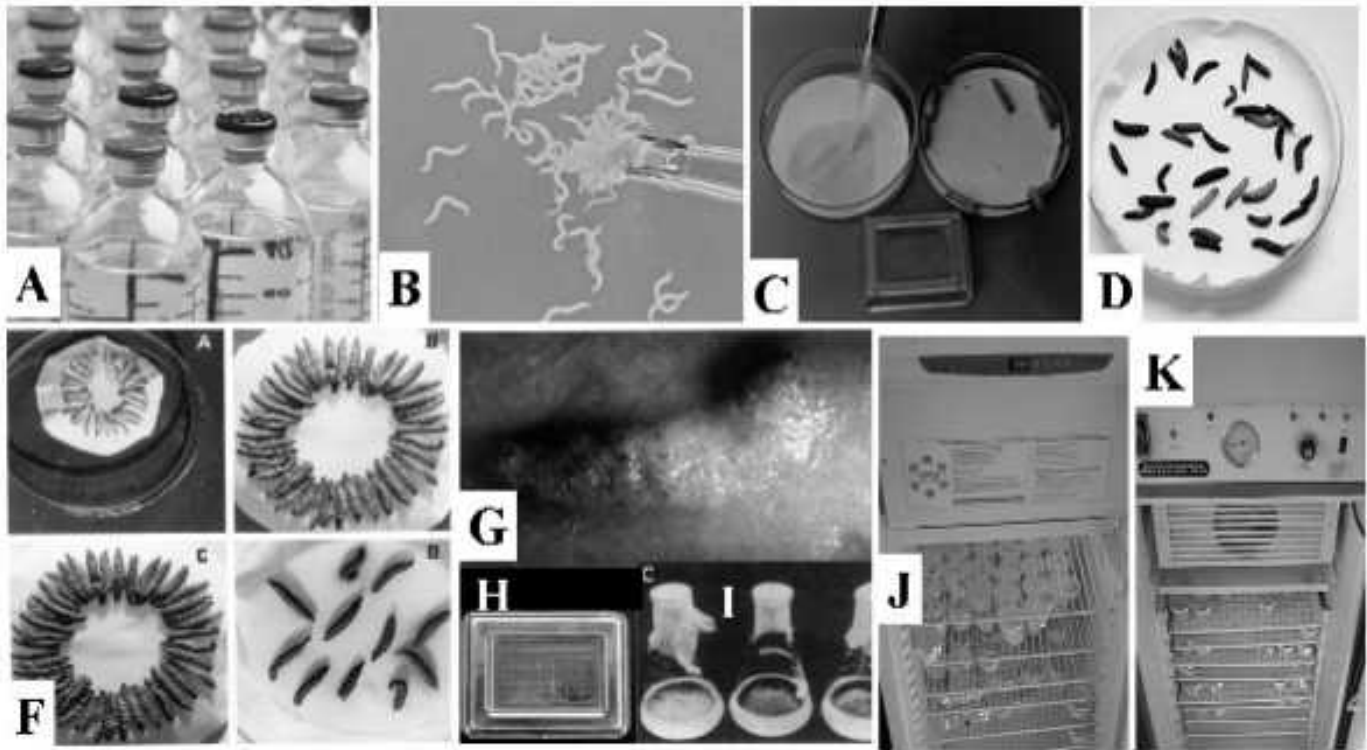


Figura 1. Esquema general del proceso de producción y almacenamiento de nemátodos entomopatógenos.

y tiempo fue significativa ($P < 0,05$) para las seis especies de nemátodos.

Para la especie *S. carpocapsae* se presentaron PSN entre 81 y 96%, en un rango amplio de temperaturas entre 8 y 20°C, donde 12 y 16°C fueron las temperaturas que presentaron los mayores PSN. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) a favor del menor tiempo de evaluación (15 días) en todas las temperaturas, presentando los mayores PSN. No se encontraron diferencias en la concentración de JI empleada, don-

de para la mayor y menor concentración de JI a 16°C, se obtuvieron los mayores PSN (94,05 y 95,68%) y para 12°C se obtuvieron 91,65 y 90,08% respectivamente (Tabla 1). De esta forma los JI de *S. carpocapsae* podrían almacenarse en alta concentración a 16 y 12°C en corto tiempo con alta viabilidad, ya que presentan una respuesta similar a la encontrada con la menor concentración para las mismas temperaturas, esto con fines de uso práctico en pruebas de control biológico, con nemátodos de alta virulencia. Podría incrementarse el tiempo de almacena-

miento a tres meses, utilizándose una baja concentración a 12°C, pero con una reducción en la supervivencia hasta 77,65%, para obtener nemátodos viables para simple preservación.

De la misma forma, para la especie *S. glaseri*, se presentaron PSN (83 y 98%), en un rango amplio de temperaturas entre 8 y 20°C. Así temperaturas de 8, 12 y 16°C fueron las que presentaron la mayor supervivencia. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) a favor del menor tiempo de evaluación (15 días) en todas las temperaturas con los mayores PSN. También se presentaron diferencias ($P < 0,05$) en la concentración de JI en las temperaturas donde se presentó supervivencia, a excepción de la temperatura 20°C, donde no se presentaron diferencias entre las concentraciones. Así los mayores PSN de 97,96, 94,95 y 94,99% se obtuvieron en la menor concentración a 8, 12 y 16°C respectivamente (Tabla 2).

Los JI de *S. glaseri* preferencialmente podrían almacenarse en baja concentración entre 8 y 16°C en corto tiempo con alta viabilidad. También alta concentración podrían emplearse a mayores temperaturas, entre 16 y 20°C, almacenando nemátodos con una viabilidad de 84,11 y 85,75% la cual es relativamente alta; esto en el caso de obtener un alto número de nemátodos producidos con fines de

Tabla 1. Supervivencia de *S. carpocapsae*

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	87.40 Aa	80.87 Ab
	3 meses	60.37 Bb	55.81 Bb
12	15 días	91.65 Ab	90.08 Ab
	3 meses	77.65 Ba	60.94 Bb
16	15 días	94.05 Ab	95.68 Ab
	3 meses	49.76 Ba	28.97 Bb
20	15 días	81.13 Aa	78.14 Ab
	3 meses	35.74 Ba	15.55 Bb
24	15 días	66.11 Aa	52.73 Ab
	3 meses	6.40 Bb	6.55 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

uso práctico en corto tiempo. También podría incrementarse el tiempo de almacenamiento a tres meses con baja concentración a 12°C, con una leve reducción en la supervivencia a 82,88%, para el caso de obtener nemátodos de alta viabilidad para preservación.

Para la especie *S. arenarium*, se presentaron PSN entre 87 y 96% en un rango intermedio de temperaturas entre 12 y 20°C, donde 12 y 16°C fueron las temperaturas ideales. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) a favor del menor tiempo de evaluación (15 días) en la mayoría de las temperaturas, a excepción de la temperatura de 8°C donde el tiempo de almacenamiento no influyó en la supervivencia, la cual fue similar en ambos tiempos, pero donde la temperatura incidió en la baja supervivencia. Por otra parte no se presentaron diferencias en concentración de JI, principalmente en las temperaturas con las mayores supervivencias, donde para la mayor y menor concentración se obtuvieron PSN de 90,60 y 88,77% a 12°C y de 95,89 y 95,01 a 16°C respectivamente (Tabla 3).

De esta forma los JI de *S. arenarium* podrían almacenarse en corto tiempo en baja y alta concentración a 16 y 12°C con viabilidad superior al 88% para fines prácticos. De la misma forma que sucedió con los otros steinernemátidos, podría incrementarse el tiempo de almacenamiento a tres meses en alta concentración a 12°C, obteniendo nemátodos con viabilidad de 80,90% con el objetivo de mejorar su preservación.

Por otra parte, los heterorhabdítidos también presentaron diferencias ($P < 0,05$) en tiempo de almacenamiento, concentración y un reducido rango de temperaturas en las cuales se obtuvieron altos PSN.

H. bacteriophora solamente presentó un PSN moderadamente alto de 78,13% a 24°C en la menor concentración y en el menor tiempo evaluado. Los otros PSN fueron inferiores al 57%, decreciendo con la disminución de la temperatura y con el aumento del tiempo y concentración. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) en alta proporción a favor del menor tiempo de evaluación y de la menor concentración de JI en las mayores temperaturas evaluadas (16 a 24°C). En temperaturas inferiores a 16°C, la supervivencia fue baja considerando que estas temperaturas no garantizan condiciones de supervivencia junto con las concentraciones y tiempo evaluados. (Tabla 4).

Tabla 2. Supervivencia de *S. glaseri*

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	97.96 Aa	82.94 Ab
	3 meses	72.43 Ba	51.62 Bb
12	15 días	94.95 Aa	87.05 Ab
	3 meses	82.88 Ba	69.23 Bb
16	15 días	94.99 Aa	84.11 Ab
	3 meses	62.01 Ba	36.07 Bb
20	15 días	86.85 Aa	88.75 Aa
	3 meses	25.18 Bb	7.39 Bb
24	15 días	52.28 Aa	14.17 Ab
	3 meses	10.13 Bb	3.23 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

Tabla 3. Supervivencia de *S. arenarium*

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	51.68 Bb	66.97 Aa
	3 meses	50.37 Ba	43.01 Bb
12	15 días	90.60 Aa	88.77 Aa
	3 meses	80.90 Ba	50.30 Bb
16	15 días	95.89 Aa	95.01 Aa
	3 meses	45.83 Ba	24.12 Bb
20	15 días	87.09 Aa	72.99 Ab
	3 meses	27.47 Ba	15.83 Bb
24	15 días	56.01 Aa	47.39 Ab
	3 meses	5.60 Bb	2.85 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

Tabla 4. Supervivencia de *H. bacteriophora*

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	6.34 Aa	0 Bb
	3 meses	0.98 Ba	0 Ba
12	15 días	38.21 Aa	8.81 Ab
	3 meses	16.66 Ba	0.88 Bb
16	15 días	52.99 Aa	16.04 Ab
	3 meses	12.28 Ba	2.63 Bb
20	15 días	57.20 Aa	23.20 Ab
	3 meses	16.38 Ba	0.63 Bb
24	15 días	78.13 Aa	34.53 Ab
	3 meses	18.06 Ba	1.04 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

Así, para *H. bacteriophora* almacenada en alta concentración y durante 3 meses, no facilitaría la supervivencia del nemátodo, ya que se obtuvieron PSN inferiores al 34,53% y 2,63% respectivamente. Posiblemente, un tiempo corto de 15 días a un mes, en concentraciones mas bajas, teóricamente podrían incrementar la viabilidad de los JI, siendo necesario multiplicar nuevamente el nemátodo.

Por el contrario la cepa *H. bacteriophora* HP88, presentó una alta supervivencia (71 y 88%) en un rango de temperaturas mas bajas (16 y 24°C) con relación a *H. bacteriophora*. Las temperaturas de 20 y 24°C, fueron las mejores para *H. bacteriophora* HP88, con PSN de 87,64 y 82,20% respectivamente (Tabla 5).

Temperaturas inferiores a 12°C, en las concentraciones y tiempos evaluados, no favorecieron la supervivencia del nemátodo. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) a favor del menor tiempo de evaluación (15 días) en todas las temperaturas y también a favor de la menor concentración de JI.

A pesar de las diferencias entre la baja y alta concentración a 20 y 24°C la viabilidad en alta concentración es moderadamente alta y próxima a los mayores PSN en la menor concentración para las mismas temperaturas, con 68,08 y 71,23% respectivamente, lo que daría a entender que esta especie soporta una alta concentración de inóculo, sin incidir en su viabilidad. De esta forma, JI de *H. bacteriophora* cepa HP88 podrían almacenarse en una concentración intermedia o inferior a 5000JI/mL a 20 y 24°C en corto tiempo, y obtener una alta viabilidad, próxima a la encontrada con la menor concentración para estas mismas temperaturas. El tiempo de almacenamiento definitivamente debe estar entre 15 días a un mes ya que en 3 meses, con ninguna concentración ni temperatura, se logro obtener una alta viabilidad, por lo cual tanto para fines de uso como de manutención esta especie se debe multiplicar periódicamente.

H. baujardi cepa LPP7 fue la única especie entre los heterorhabditidos, que presentó el más alto PSN (91,98%) con el menor tiempo y concentración y con la mayor temperatura empleada (24°C). El otro PSN de importancia fue en la misma temperatura pero con la mayor concentración (80,25%) (Tabla 6).

Los otros PSN fueron inferiores al 67,38% registrado a 20°C, decreciendo a medida que disminuye la temperatura y

aumenta la concentración. Existieron diferencias en supervivencia (Scott-Knott $P < 0,05$) a favor del menor tiempo de evaluación y de la menor concentración en todas las temperaturas.

Con relación a los otros heterorhabditidos, *H. baujardi* cepa LPP7 presenta la ventaja de que en alta temperatura (24°C), independientemente de la concentración, arroja una alta viabilidad en corto tiempo, con lo cual para fines de uso y manutención es recomendable estar multiplicando periódicamente, para obtener JI viables. Posiblemente una concentración intermedia, podría presentar una alta viabilidad para preservación del nemátodo para un tiempo superior a 15 días, ya que en las condiciones del experimento, para un tiempo de tres meses en

alta concentración, la viabilidad del nemátodo decrece drásticamente hasta un 21%.

Finalmente, en todos los heterorhabditidos se observó para el tiempo final de evaluación, una reducción en la cantidad de lípidos presentando estos un mayor tamaño al visualizar los JIs muertos al estereoscopio con relación a JI recién emergidos, aspecto que posiblemente estaría influenciado no solo por la naturaleza de los nemátodos, sino por la temperatura y/o tiempo de almacenamiento, incidiendo en la baja supervivencia. Caso contrario sucedió con steinernematidos para el tiempo final de evaluación, donde mantienen estable su cantidad de lípidos, presentando viabilidad, lo cual podría ser otro indicativo para

Tabla 5. Supervivencia de *H. bacteriophora* HP88

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	0	0
	3 meses	0	0
12	15 días	0	0
	3 meses	0	0
16	15 días	70.58 Aa	44.83 Ab
	3 meses	9.39 Ba	0.44 Bb
20	15 días	87.64 Aa	68.08 Ab
	3 meses	24.66 Ba	0.11 Bb
24	15 días	82.20 Aa	71.23 Ab
	3 meses	17.38 Ba	0.22 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

Tabla 6. Supervivencia de *H. baujardi* LPP7

Factores		Concentración (JI/mL)	
T (°C)	Tiempo	1000	10000
8	15 días	0	0
	3 meses	0	0
12	15 días	13.76 Aa	3.99 Ab
	3 meses	4.82 Ba	0 Bb
16	15 días	38.86Ab	43.0 Aa
	3 meses	3.59 Ba	0 Bb
20	15 días	67.38 Aa	60.92 Ab
	3 meses	10.39 Ba	0 Bb
24	15 días	91.98 Aa	80.24 Ab
	3 meses	21.14 Ba	1.58 Bb

Promedios (%) seguidos por la misma letra minúscula en la fila y mayúscula en la columna no difieren significativamente según el test Scott-Knott ($p < 0,05$)

Tabla 7. Ecuaciones de regresión para las especies *S. carpocapsae* y *S. glaseri*

Factores	Ecuación <i>S. carpocapsae</i>	R ² %	Ecuación <i>S. glaseri</i>	R ² %
15d/1000JI	$Y=67,45+3,33X-0,11X^2$	98,47	$Y=177,78-19,71X+1,52X^2-0,038X^3$	99,95
15d/10000JI	$Y=-23,68+21,40X-1,22X^2+0,02X^3$	87,51	$Y=279,06-49,05X+3,84X^2-0,094X^3$	96,43
3m/1000JI	$Y=-98,74+35,31X-2,22X^2+0,04X^3$	96,16	$Y=-166,53+54,35X-3,62X^2+0,0069X^3$	99,82
3m/10000JI	$Y=-92,98+36,37X-2,63X^2+0,05X^3$	97	$Y=-258,32+71,57X-4,88X^2+0,098X^3$	99,45

Tabla 8. Ecuaciones de regresión para las especies *S. arenarium* y *H. bacteriophora*

Factores	Ecuación <i>S. arenarium</i>	R ² %	Ecuación <i>H. bacteriophora</i>	R ² %
15d/1000JI	$Y=-127,54+32,68X-1,39X^2+0,015X^3$	99,36	$Y=-192,92+40,12X-2,25X^2+0,04X^3$	99,78
15d/10000JI	$Y=47,59+2,84X+0,19X^2-0,013X^3$	94,09	$Y=-12,01+1,39X+0,022X^2$	99,55
3m/1000JI	$Y=-249,64+66,69X-4,27X^2+0,08X^3$	95,21	$Y=-94,32+20,03X-1,19X^2+0,02X^3$	88,63
3m/10000JI	$Y=-158,43+46,88X-3,19X^2+0,06X^3$	90,98	$Y=-10,86+2,15X-0,12X^2+0,002X^3$	56,59

Tabla 9. Ecuaciones de regresión para las especies *H. bacteriophora* HP88 y *H. baujardi* LPP7

Factores	Ecuación <i>H. bacteriophora</i> HP88	R ² %	Ecuación <i>H. baujardi</i> LPP7	R ² %
15d/1000JI	$Y=219,39-58,01X+4,58X^2-0,099X^3$	93,96	$Y=-27,56+2,36X+0,11X^2$	99,59
15d/10000JI	$Y=241,59-60,40X+4,54X^2-0,11X^3$	99,21	$Y=-36,37+3,39X+0,07X^2$	95,50
3m/1000JI	$Y=39,21-9,60X+0,69X^2-0,01X^3$	99,60	$Y=109,03-28,77X+2,24X^2-0,04X^3$	98,67
3m/10000JI	$Y=0,49-0,17X+0,02X^2+0,0004X^3$	63,14	$Y=-33,25+7,65X-0,54X^2+0,01X^3$	98,27

prolongar por mas tiempo su almacenamiento, ya que no han hecho uso de parte de sus reservas lipídicas.

En las tablas 7, 8 y 9, se presentan las ecuaciones de regresión estimadas para cada especie de nemátodo, representando la viabilidad de las diferentes especies a diferentes concentraciones y tiempos de evaluación, según las temperaturas evaluadas.

De acuerdo con Kaya y Stock (1997), los nemátodos pueden ser almacenados con alta viabilidad en un rango de temperaturas que varían de 4 a 15°C de 6 a 9 meses para steinernematidos y de 3 a 4 meses para heterorhabdítidos. En el experimento se encontró que un rango de 8 a 16°C es el más adecuado para almacenar steinernematidos con alta viabilidad en cualquier concentración hasta un periodo inclusive superior a tres meses; la supervivencia comienza a decrecer levemente en baja concentración de inóculo para este tiempo. Temperaturas de almacenamiento superiores de 20 a 24°C, comenzaron a afectar la supervivencia de estos steinernematidos. Por el contrario este rango de temperatura benefició a los heterorhabdítidos, los cuales presentaron alta supervivencia a mayores temperaturas y a baja concentración de inóculo en corto tiempo. De la misma forma, temperaturas inferiores a 16 grados afectaron la supervivencia de este grupo de nemá-

todos, los cuales consiguen sobrevivir hasta tres meses pero con muy baja supervivencia; por esto, se deben estar multiplicando frecuentemente.

Esta diferencias en la supervivencia en condiciones de almacenamiento tanto para steinernematidos y heterorhabdítidos posiblemente obedecen a su adaptación térmica adquirida desde los lugares de origen de donde fueron aislados.

De acuerdo con Kaya (1990), temperaturas superiores a 30°C o inferiores a 9°C, afectan la persistencia de NEP, variando entre las especies. Especies subtropicales como *S. glaseri* persisten en el medio por más tiempo a temperaturas entre 10 y 35°C que a temperaturas inferiores a 5°C; *S. carpocapsae* persiste más tiempo entre 5 y 15°C que a 35°C. También la adaptación a diferentes temperaturas depende del lugar de aislamiento; así, heterorhabdítidos aislados de las regiones templadas persisten mejor a temperaturas más bajas que los aislados en áreas tropicales, en donde resisten altas temperaturas, tal es el caso de *Heterorhabditis indica* (Kaya 1990). De acuerdo con Segal y Glazer (2000), especies como *H. bacteriophora* HP88 presentan una alta tolerancia al calor, prolongando su supervivencia por 6 horas a 37°C, lo que explicaría posiblemente la alta supervivencia encontrada en el experimento en temperaturas altas de almacenamiento, no

solo en el caso *H. bacteriophora* HP88, sino para *H. baujardi* LPP7. Esta especie presentó una alta supervivencia a 24°C. Probablemente, a temperaturas mayores este nematodo podría lograr alta supervivencia. Estas características de adaptación a temperaturas mayores podrían beneficiar heterorhabdítidos, no solo para almacenamiento en laboratorio sino para su uso en campo, en programas de control biológico en áreas de alta temperatura.

Precisamente una de las mayores causas que impide a los NEP alcanzar su potencial en control biológico es su sensibilidad a altas temperaturas del medio y también en almacenamiento, donde algunas especies son poco termotolerantes para sobrevivir (Kaya y Gaugler 1993). Este aspecto restringe la aplicación de NEP en ambientes de alta temperatura, principalmente en aplicaciones foliares (Kaya 1990).

Por otra parte, la persistencia de steinernematidos asociada a bajas temperaturas, puede depender más de la tolerancia al frío por naturaleza, que de la cantidad de reservas energéticas (Grewal 2000). Molineux (1985) afirma que bajas temperaturas inducen no solo inactividad de los JI, sino un aumento en su persistencia en el tiempo, ya que existe una disminución en la actividad enzimática y en los gastos metabólicos. De esta forma, comienza una acumulación de trehalosa

y reducción en los niveles de lípidos, característico de steinernematidos como *S. carpocapsae*, con alta supervivencia en el tiempo (Kaya 1990). Los JI de *S. feltiae* entran en inactividad a 5°C, comenzando a acumular trehalosa y sólo a 20°C logran activarse. Al parecer los JI parecen experimentar un periodo obligatorio de inactividad, indicando el establecimiento de un estado de diapausa (un estado temporal de inactivación por temperatura asociado con una fase de morfogénesis), en el cual son incapaces inclusive de infectar hasta recuperar su viabilidad a temperatura de acondicionamiento (Fan y Hominick 1991).

Estas características de tolerancia al frío y acumulación de trehalosa, pudieron favorecer la supervivencia principalmente de los steinernematidos empleados en el experimento, prolongando su persistencia y viabilidad en el tiempo, aspecto que no sucedió en los heterorhabditidos, donde en el tiempo final de evaluación exhibieron agotamiento de sus reservas lipídicas y una alta mortalidad.

Conclusiones

En nemátodos steinernematidos temperaturas de almacenamiento de un rango amplio de 8 a 20°C indiferente de la concentración empleada, favorecieron la alta supervivencia de los JI, prolongando su viabilidad hasta tres meses.

En nemátodos heterorhabditidos temperaturas de almacenamiento en un rango entre 16 a 24°C, en la menor concentración y para un tiempo entre 15 días y el mes de almacenamiento, favorecieron la alta supervivencia de los JIs.

Cada especie de NEP, tiende a presentar características particulares de temperatura, concentración y tiempo de almacena-

miento para su preservación con alta supervivencia.

Recomendaciones

Implementar el almacenamiento de estas especies teniendo en cuenta la concentración de JI, el tiempo y la temperatura, para así mejorar su supervivencia con fines de control biológico y/o manutención de los mismos.

Para futuros trabajos se recomienda evaluar condiciones similares de bioensayo, empleando otros sustratos para almacenar nemátodos, con el objetivo de mejorar su supervivencia en el tiempo.

Agradecimientos

A la Dra. Claudia Dolinski del Departamento de Produção Vegetal de la Universidade Estadual do Norte Fluminense "UENF" (Campos dos Goytacazes-RJ-Brasil) y a la Dra. Marineide Aguilera, de la Universidade Federal de São Carlos (Araras-SP-Brasil) por su colaboración y constate incentivo.

Literatura citada

- EHLERS R. U. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology* 6: 303-316.
- FAN, X.; HOMINICK M. W. 1991. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). *Revue Nematologia*. 14:407-412.
- GEORGIS, R.; S. A. MANWEILER. 1994. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. *Agriculture Zoology Review* 6:63-94.
- GREWAL, P.S. 2000. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae).

International Journal for Parasitology 30, p. 995-1000.

- KAYA, H. K.; STOCK, P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press p.281-324.
- KAYA, H. K. 1990. Soil ecology. En: Entomopathogenic nematodes in biological control. R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93-115.
- KAYA, H. K.; GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38:181- 206.
- MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. 2003. Supervivencia y parasitismo de nemátodos entomopatogénos para el control de *Hypothenemus hampei*, (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. *Revista Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 29(4): 523-533.
- MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. 2001. Producción in vivo de tres entomonemátodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología* 27(1-2): 73-78.
- MOLINEUX A. C. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp and *Steinernema* spp (Nematoda: Rhabditida) at varies temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Review Nematology* 8: 165.
- SEGAL, D.; GLAZER, I. 2000. Genetics for improving biological control agents: the case of entomopathogenic nematodes. *Crop Protection* 19: 685-689.
- SMITS, P. H. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 6: 379-387.
- WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

Recibido: 03-mar-05 • Aceptado: 16-ago-05