

# CULTIVO *IN VIVO* Y METODO DE ALMACENAMIENTO PARA JUVENILES INFECTIVOS DE *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae)

## Cultivation *in vivo* and method of storage for infective juveniles of *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae)

Adriana Sáenz<sup>1</sup> y Jesús Emilio Luque<sup>2</sup>

### RESUMEN

*Steinernema feltiae*, es un entomonemátodo que afecta principalmente plagas asociadas al suelo, su ciclo tiene dos generaciones y se obtiene un gran número de juveniles infectivos (J3) en cultivos *in vivo*, utilizando insectos hospederos. Por ello, de acuerdo a estas características se evaluó la producción de J3 a partir de suspensiones ajustadas de 100, 300, 500, 700 y 1000 J3 en larvas de último instar de la polilla mayor de las colmenas *Galleria mellonella* y polilla menor de las colmenas *Achroia grisella*, además de almacenar concentraciones de 10,000, 30,000 y 50,000 J3 en suelo esterilizado, pasteurizado y natural -sin tratamiento- por seis meses, para determinar la viabilidad y patogenicidad de los juveniles infectivos. El diseño experimental utilizado para el cultivo *in vivo* correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x6 con diez repeticiones, para *G. mellonella* y un diseño completamente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones para *A. grisella*. En cuanto al diseño utilizado para almacenamiento, correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x3 con submuestreo. Los resultados obtenidos del cultivo *in vivo*, presentan diferencias en tamaño/peso de larvas de la polilla mayor de las colmenas y la producción de juveniles infectivos, siendo el tamaño pequeño el de menor producción con 510,55 J3/larvas respecto al de los otros dos tamaños. En *A. grisella*, no existen diferencias significadas entre las concentraciones y la cantidad de juveniles infectivos cosechados. En cuanto a la sobrevivencia de los juveniles almacenados en suelo presenta diferencias significativas en concentración y tiempo de almacenamiento, además el tratamiento al suelo no influye en la sobrevivencia de los J3. Sin embargo recuperar los J3 a partir de esta forma de almacenamiento es baja, no obstante, la patogenicidad de los J3 recuperados es superior en suelo pasteurizado que en los otros dos tratamientos.

**Palabras claves:** *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, entomonemátodo, concentración, tamaño de larva.

### SUMMARY

The entomonematode *Steinernema feltiae*, affects mainly plagues associated with soil. This nematode has two generations and a

great number of infective juveniles (J3) when innkeeper insects are used for cultivation. Production of J3 was evaluated with starting suspensions of 100, 300, 500, 700 and 1000 J3 in larvae of last urge of bigger moth of *Galleria mellonella* and with larvae of smaller moth of *Achroia grisella*. Pathogeny of the infective juveniles was studied using concentrations of 10,000, 30,000 and 50,000 J3, in sterilized, pasteurized and natural soil (without treatment) for six months. A completed random design with factorial arrangement of 3x6 with ten repetitions, was used for *in vivo* cultivation of *G. mellonella* for *A. grisella* a completed random design with six treatments and ten repetitions was used. For storage variable, a completed random design with factorial arrangement of 3x3 was analyzed. The results from *in vivo* cultivation presented differences in larvae size and weight of the bigger moth of the beehives. Small infective juveniles produced the smaller size in production (510.55 J3/larvae). In *A. grisella*, there were not differences between the concentrations and the quantity of infective juveniles gathered. The survival in soil of juvenile ones presented significant differences for concentration and time of storage, also the treatment to the soil did not influence in the J3's survival. However, to recover the J3 starting from this storage form is low, nevertheless, the recovered of J3's pathogeny is superior in pasteurized soil than the others two treatments.

**Key words:** *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, entomonematode, concentration, larvae size.

### INTRODUCCION

*Steinernema feltiae* Filipjev, tiene un ciclo de vida simple, es parásito obligado y utiliza una variedad de especies de insectos como hospederos (Stock, 1998). El estado infectivo es el juvenil de tercer estado (J3), adaptado para localizar e infectar nuevos hospederos en campo (Poinar, 1990). Los juveniles infectivos penetran el hemocele del insecto por la boca, ano o espiráculos y liberan la bacteria simbiote *Xenorhabdus bovienii* desde la porción ventricular de su intestino, la cual se multiplica dentro del hospedero y en asociación con el entomonemátodo, lo matan (Akhurst y Dunphy, 1993; Sáenz, 1998, 1999). Pero, el destino de la bacteria en el hemocele varía con la especie de insecto y el estado fisiológico del mismo.

<sup>1</sup> Bióloga, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. E-mail: adsaenz@poligran.edu.co/adrinemato@yupimail.com

<sup>2</sup> Biólogo, Entomología. Facultad Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490 Bogotá.

Invasión del hospedero y superada su respuesta de defensa, la bacteria y los estados de desarrollo del entomonemátodo, son capaces de utilizar el cadáver para producir las próximas generaciones de J3 llevando su bacteria simbiote. Los factores involucrados en este proceso son dos: conversión del cadáver del hospedero en nutrientes, para ser usados por los entomonemátodos (J1, J2, J3, J4, adultos) y la protección de estos nutrientes de competidores. El primero es realizado por el metabolismo de la bacteria y el último por una combinación del mantenimiento de la integridad de la cutícula del hospedero y remoción de microorganismos no simbióticos, por la producción de compuestos antimicrobiales, que inhiben la actividad de microfauna saprófaga. Los entomonemátodos se alimentan, producen una generación anfimictica en *Achroilla grisella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae); dos generaciones anfimicticas en *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Clavipalpus ursinus* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Sáenz, 1998, Sáenz y Luque, 2000). Posteriormente, emergen del cadáver como J3 para buscar un nuevo hospedero.

Obtenidos los J3, se deben almacenar para continuar con estudios posteriores de acuerdo a los objetivos de las investigaciones propuestas, sin embargo uno de los inconvenientes es mantener gran número de J3 viables y patogénicos, lo cual depende de la técnica de almacenamiento a corto o largo plazo. Los entomonemátodos pueden ser almacenados bajo refrigeración en agua oxigenada por cinco años (Friedman, 1990), pero esta metodología no es comercialmente factible. Además, el metabolismo de los entomonemátodos a temperaturas de 20° a 30°C incrementa la actividad metabólica, reduciendo la viabilidad de los J3 (Georgis, 1990). Por lo tanto, el disminuir la actividad de los nemátodos, a través de la inmovilización o desecación parcial en o sobre un substrato de alginato, arcilla o vermiculita, incrementan su capacidad de almacenamiento, por seis meses bajo refrigeración y tres meses a temperatura ambiente (Kaya y Gaugler, 1993; Stock, 1998)

Con posterioridad al hallazgo del entomonemátodo *S. glaseri*, Glaser (1931), McCoy y Girth (1938), desarrollan diversas técnicas de cultivo en medios artificiales, con el fin de lograr la producción de este entomonemátodo. No obstante, este método de cría, es apropiado para producción en laboratorio a gran escala o comercial. Actualmente los Steinernematidos y Heterorhabditidos pueden ser multiplicados *in vivo* empleando insectos como hospedantes alternativos, fáciles de criar y que no requieran excesivos costos de producción, como los descritos por Poinar (1979), quien da referencias de las diferentes técnicas empleadas para este fin, las cuales derivan de la técnica empleada por Dutky *et al.* (1964)

Bajo este contexto, el presente estudio evaluó la producción *in vivo* de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *S. feltiae*, en larvas de último instar del hospedero convencional *Galleria mellonella* y en *Achroilla grisella*, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente. Además, se probó el almacenamiento en suelo por un período de seis meses, corroborando viabilidad y patogenicidad de los J3.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Control Biológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, de Bogotá bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente.

### Material Entomológico

Se utilizaron como insectos hospederos larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L) y *Achroia grisella* (F), criadas en laboratorio con dieta artificial (Garzón y Aza, 1994; Sáenz, 1998)

### Obtención del Entomonemátodo Nativo

Para los ensayos de cría *in vivo* y almacenamiento en suelo, se obtuvieron 1.415.000 juveniles infectivos de *S. feltiae* de las existencias de almacenamiento del laboratorio de control biológico de la Facultad de Agronomía; los cuales se encuentran almacenados a 10°C, en recipientes de 20 ml, conteniendo 2 ml de agua destilada y 30 (1 de Tritonx100 (Sáenz, 1998).

### Cultivo *in vivo*

- La producción *in vivo* de los J3 se realizó en tres etapas:
  - Infección: período por el cual los juveniles infectivos entran al insecto y aparecen los síntomas de patogenicidad.
  - Multiplicación (incubación): período en que los entomonemátodos dentro del insecto desarrollan su ciclo de vida a partir del estadio juvenil infectivo (J3).
  - Recuperación: colección de los juveniles infectivos para almacenamiento.

La etapa de infección se inició con una suspensión ajustada de 100, 300, 500, 700 y 1000 J3/ml, y uniformemente distribuida en un círculo de papel filtro (9 cm), ubicado en la tapa de una caja de petri. Posteriormente, se adicionó 1 larva de último instar de *G. mellonella* de tres tamaños/ peso aproximado - grande: 2-3 cm, 0,25-0,35 gr; mediana: 1,5-2 cm, 0,18-0,23 gr; pequeña: 0,8-1 cm, 0,9-0,16 gr; - y larvas de *Achroia grisella*, para evaluar la obtención de J3/larva, porcentaje de sobrevivencia de J3 por trampa de White (J3 muertos y vivos), tiempo de incubación, sobrevivencia y producción de juveniles infectivos a partir de la primera cosecha. Además de establecer cual es el mejor tamaño de larva (para *G. mellonella*) con relación a la producción de J3/ml y la concentración aplicada/larva vs. producción. Cada caja de petri se etiquetó con vinilpel - para conservar la humedad - y se almacenó a temperatura ambiente (20°C). Después de determinar los signos y síntomas a las 24, 48 y 72 horas, hasta la muerte de las larvas, los cadáveres se colocaron en cajas de petri con papel filtro seco por dos días para su incubación y posterior montaje de trampas de White (White, 1927).

En cuanto a la cosecha de los J3 desde las trampas de White, se removió el disco interno que contiene los cadáveres y se ubicó de nuevo en otra caja de petri. La suspensión obtenida de los J3 se sirvió en un vaso de precipitación para su enjuague posterior y conteo de los entomonemátodos. Este procedimiento se realizó diariamente hasta obtener suspensiones sin presencia de J3. Si las suspensiones de entomonemátodos contenían pocos residuos de tejidos del insecto, se dejaron 20 a 30 minutos hasta que los J3 quedarán en el fondo, se decantó el agua y se adicionó de nuevo agua al vaso. Este procedimiento se realizó tres veces. En otros casos, si las suspensiones presentaron bastantes tejidos, se pasaron por tamices de 125, 53, 43, 38 y 25 micras, se enjuagaron con ayuda de un «spray» y centrifugaron por 2 ó 3 minutos a 250 revoluciones por minuto (81 g), se decantó el sobrenadante, se adicionó agua y se repitió el proceso tres veces (Stock, 1998).

### Almacenamiento de J3

Los juveniles infectivos se almacenaron en sólido, utilizando 120 g de suelo autoclavado, pasteurizado y natural - sin tratamientos - aplicando una concentración de 10.000, 30.000 y 50.000 J3/ml,

mantenidos en bolsas plásticas a 8°C. Cada mes se tomaron submuestras de suelo de 10 g utilizando la técnica del embudo de Baermann, para establecer el número de entomonemátodos vivos, durante este período. Esto se realizó por un período de 6 meses. Los entomonemátodos obtenidos de los muestreos, se inocularon a larvas de *G. mellonella*, para determinar su patogenicidad.

#### Patogenicidad de J3 almacenados

Se realizaron con 5 larvas por réplica (5 réplicas) de *G. mellonella* y se confinaron individualmente en platos de 12 cavidades con papel filtro, 80 µl de agua destilada estéril y 80 µl de la suspensión de entomonemátodos de diferentes tiempos de almacenamiento y DL50, anteriormente establecida. Al testigo se le adicionaron 2 µl de agua estéril. Las cajas se sellaron con vinilpel bajo oscuridad y condiciones de laboratorio (20°C y 60% HR). A los tres días el número de larvas muertas y vivas se contaron, las muertas se disectaron en una caja de vidrio (60x15mm) con dos agujas de disección y 0.1 ml de agua para facilitar la observación de los entomonemátodos bajo microscopio-estereoscópico.

#### Diseño y Análisis Estadístico

El diseño experimental utilizado para el cultivo *in vivo*, correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 6, donde los factores con diez repeticiones fueron: factor A: tamaño/peso aproximado de las larvas de último instar de *Galleria mellonella* (3); factor B: concentración de J3/ml, discriminados así: T0: testigo sin entomonemátodos, T1: 100 J3/ml, T2: 300 J3/ml, T3: 500 J3/ml, T4: 700 J3/ml, T5: 1000 J3/ml. En cuanto al diseño experimental para el ensayo con larvas de *A. grisella* corresponde a un diseño completamente al azar con seis tratamientos y diez repeticiones respectivamente y discriminados de la misma manera como en el ensayo de *G. mellonella*.

Para el cálculo de J3/larva, se utilizaron los datos obtenidos de los conteos durante las cosechas diarias hasta encontrar suspensiones sin presencia de juveniles infectivos. El método estadístico utilizado fue análisis de varianza, además de rango múltiple de Duncan en los factores que presentaron diferencias significativas.

El diseño utilizado para el almacenamiento en suelo, corresponde a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x3 con submuestreo. Los factores con tres repeticiones se discriminaron así: Factor A: tipos de suelo - natural (actúa como testigo), autoclavado y pasteurizado -, factor B: concentración de J3/ml, donde: T1: 10000 J3/ml, T2: 30000 J3/ml y T3: 50000 J3/ml. Mensualmente se tomaron 10 g de suelo al azar de cada tratamiento para determinar la supervivencia y patogenicidad de los juveniles infectivos. La herramienta estadística utilizada en estos tres ensayos de almacenamiento, correspondió a un análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Duncan en los factores que presentaron diferencias significativas.

En cuanto a los valores obtenidos del ensayos de patogenicidad, se analizaron con la ecuación de Abbott (Nguyen y Smart, 1991).

## RESULTADOS

#### Cultivo *in vivo*

Utilizando larvas de último instar de *G. mellonella*, se establecieron diferencias en tamaño/peso aproximado -grande, mediano y pequeño- y la producción de juveniles infectivos ( $F=16,358$ ;  $df=2$ ;  $P=0,0001$ ;  $\alpha=0,01$ ) (Figura. 1, 2 y 3); siendo, el tamaño peque-

ño significativo, por un promedio/día de 510,55 J3/larva, inferior al de los otros dos tamaños. Además, no existe significancia respecto a las concentraciones ( $F=3,32$ ;  $df=4$ ;  $P=0,012$ ;  $\alpha=0,01$ ) e interacción concentración-tamaño ( $F=0,545$ ;  $df=8$ ;  $P=0,821$ ;  $\alpha=0,01$ ).

Desde el período de incubación, hasta la obtención de los primeros juveniles infectivos, tomó 10 días. Así mismo, a partir de la primera cosecha se recuperaron J3 de las trampas de White, por un período promedio de 12 días con 3 picos de producción en los tres tamaños de larvas y un 95% de los J3 cosechados se encontraban viables.

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre las cinco concentraciones probadas, se pudo establecer que la concentración de 500J3/larva produjo la mayor cantidad de infectivos (grande: 645,879; mediano: 609,758; pequeño: 195,209; Figura 1, 2 y 3) y las larvas con las máximas cosechas (tamaño grande: 138,405 y 179,378 J3/larva; tamaño mediano: 157,222 J3/larva). Sin embargo, el tamaño de larva que presentó menor producción de juveniles infectivos en las cinco concentraciones fue el pequeño (Figura 4).

En cuanto a las larvas de *A. grisella*, no existen diferencias significativas entre las concentraciones y la cantidad de juveniles infectivos cosechados ( $F=0,635$ ;  $df=4$ ;  $P=0,640$ ;  $\alpha=0,01$ ). Sin embargo, la producción total más alta de 10 replicas, corresponde a la concentración de 100J3/larva (Figura 5). Por otra parte, el porcentaje de sobrevivencia de los juveniles en las trampas de White fue del 98%, con cosechas hasta el octavo día y dos picos de producción. Además, los primeros juveniles se observaron después de los seis días de infección.

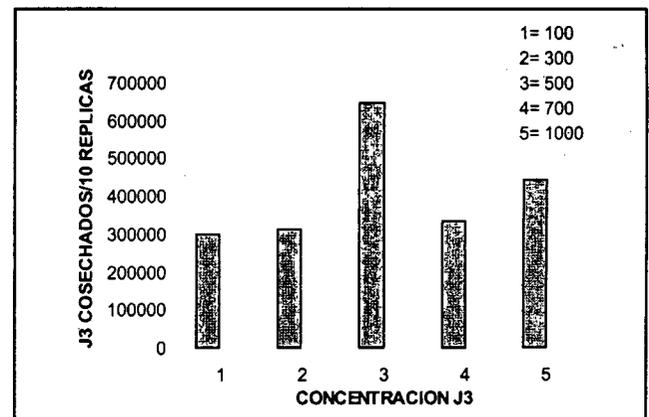


Figura 1. Producción de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* en larvas grandes de *Galleria mellonella*.

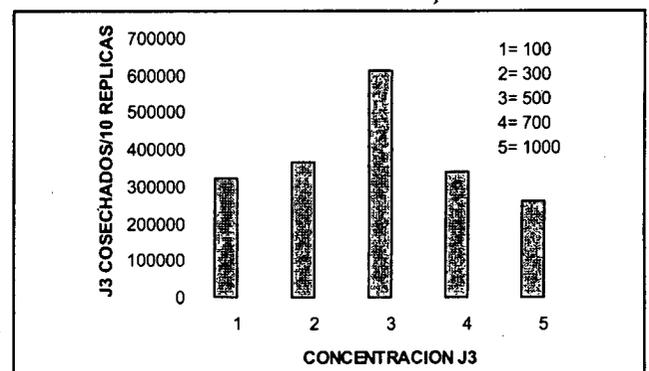


Figura 2. Producción de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* en larvas medianas de *Galleria mellonella*.

**Almacenamiento de J3**

La sobrevivencia de los juveniles infectivos almacenados en suelo, presenta diferencias significativas en cuanto a la concentración (F=9,81; df=2; P=0,001;  $\alpha=0,01$ ), tiempo de almacenamiento (F=36,55; df=5; P=0,0001;  $\alpha=0,01$ ) e interacción concentración-tiempo (5,94; df=10; P=0,0001;  $\alpha=0,01$ ). Por otra

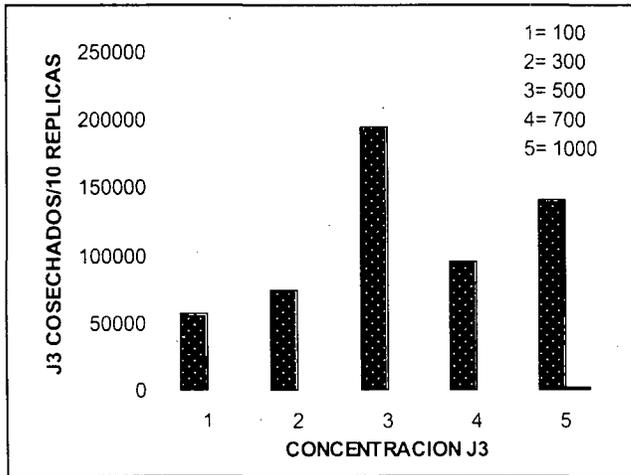


Figura 3. Producción de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* en larvas pequeñas de *Galleria mellonella*.

parte, el tratamiento realizado al suelo (pasteurización, autoclavado y sin tratamiento) no influye en la sobrevivencia de los entomonemátodos (F=2,23; df=2; P=0,133;  $\alpha=0,01$ ) y no existe interacción concentración-suelo (F=1,31; df=4; P=0,300;  $\alpha=0,01$ ), suelo-tiempo de almacenamiento (F=1,06; df=10; P=0,429;  $\alpha=0,01$ ).

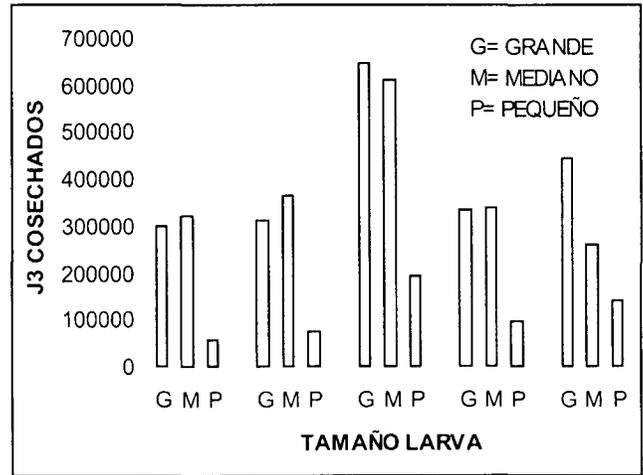


Figura 4. Producción de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* en larvas de *Galleria mellonella*.

Con la prueba de rango múltiple de Duncan, se estableció que la concentración de 10000J3 almacenados por 3 y 5 meses presento un promedio mayor de sobrevivencia, correspondiente a 665,33 y 675J3 respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de J3 recuperados de las tres concentraciones probadas, es bajo en cada muestreo (rangos de 0,70 a 9,83% en los tres tratamientos del suelo).

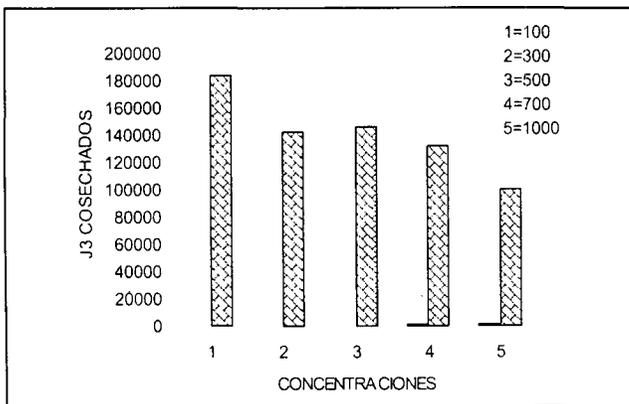


Figura 5. Producción de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* en larvas de *Achroia grisella*.

El porcentaje de sobrevivencia de juveniles infectivos de suelo pasteurizado y autoclavado se incremento ligeramente cuando la concentración de entomonemátodos fue alta (pasteurizado: 10.000= 18% (565 J3); 30.000= 38% (1207 J3); 50.000= 44% (1407 J3); Autoclavado: 10.000= 17% (563 J3); 30.000= 37% (1199 J3); 50.000= 46% (1494 J3). En el suelo natural la sobrevivencia decreció de 48% (1084 J3) en la concentración de 30.000 J3 a 31% (703 J3) en la concentración de 50.000 J3 (Figura 6).

**Patogenicidad de J3 almacenados**

La DL<sub>50</sub> establecida correspondió a 3,3 J3/larva (1,37-6,56). Por

lo tanto, la patogenicidad de los juveniles infectivos recuperados de almacenamiento, muestran un porcentaje promedio de mortalidad de larvas de último instar de *G. mellonella* durante los seis meses de muestreo, siendo superior con juveniles infectivos recuperados de suelo pasteurizado (10.000=85,16%; 30.000=85,33%; 50.000=89,66%), que de suelo autoclavado (10000=58,5%; 30.000=66,16; 50.000=75,33%) y natural (10.000=76,5%; 30.000=78,6%; 50.000=66,6%), (Figura. 7).

Sin embargo, finalizados los muestreos se empleó la técnica de Bedding para establecer la patogenicidad de juveniles infectivos sobre larvas de *G. mellonella* y *A. grisella*, expuestas directamente al suelo almacenado. De las 45 larvas/especie/tratamiento de suelo, el porcentaje de mortalidad fue de 28.8 y 33% en suelo pasteurizado; 40 y 35.5% en suelo natural; 10.5 y 7.6% en suelo autoclavado, respectivamente.

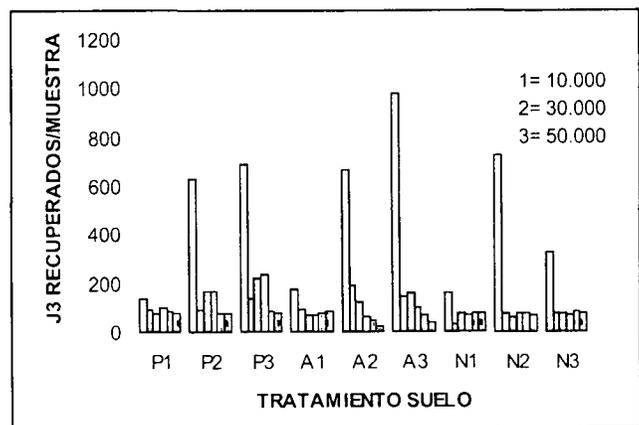


Figura 6. Muestreo mensual de juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae*, almacenados en suelo durante seis meses. P: pasteurizado; A: autoclavado; N: natural.

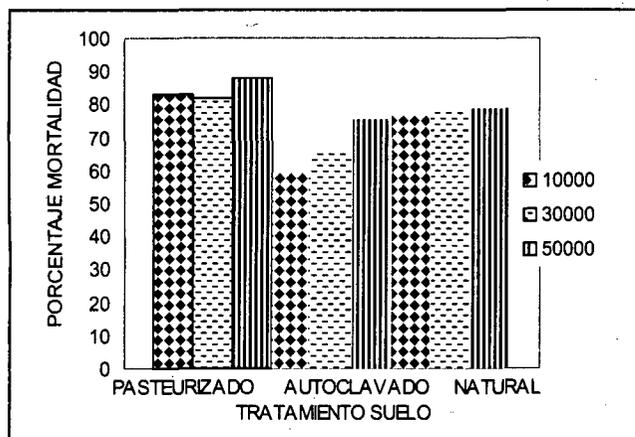


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* expuestas a Juveniles infectivos del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* almacenados en suelo.

Las larvas muertas por J3 se toman de coloración ocre (*A. grisella*), marrón oscuro (*G. mellonella*). Estos cambios de color varían según la coloración original del insecto, la cantidad de luz que refleja la cutícula y el grado de infestación (Woodring y Kaya, 1988). Además las larvas se vuelven flácidas y no toman mal olor. En disecciones, los tejidos son gomosos y se observan totalmente desintegrados:

## DISCUSION

La producción de juveniles infectivos a través de larvas de *G. mellonella*, *A. grisella* u otro hospedero, presenta ciertas ventajas y desventajas en cuanto a su potencialidad. No es muy viable en la práctica, a menos que exista una infraestructura apropiada para la cría de grandes cantidades de esos lepidópteros (de 500.000 a 1 millón de *G. mellonella* por semana, permitiendo obtener aproximadamente 100.000 entomonemátodos por cada larva), según Bonifassi y Neves (1990), estas condiciones se presentan en Europa, particularmente en el INRA de Antibes, Francia. De igual modo, en Italia, la empresa Biorre produce 50 millones J3 por semana, implementando una técnica similar (Deseo *et al.*, 1990). Asimismo, uno de los parámetros más importantes a considerar es que este método no ofrece una economía de calidad, ya que el proceso de producción *In vivo* es afectado por factores biológicos como el estado fisiológico y patológico de los insectos empleados en este proceso, que es difícil de controlar si no se toman las medidas necesarias. No obstante, la producción masiva de *G. mellonella* o *A. grisella* como hospedantes alternativos es muy sencilla y no requiere costos excesivos de producción (Sáenz, 1998). Sin embargo, esta técnica se considera inadecuada e insuficiente para lograr una producción a gran escala. Los métodos de producción *In vivo* son aconsejados para el aislamiento inicial y producción de nuevas especies o cepas de entomonemátodos, no disponibles en el mercado y realización de ensayos en el laboratorio. Por lo tanto, considerando que el entomonemátodo *S. feltiae* infecta y se reproduce en un amplio espectro de hospederos, las técnicas de cultivo *in vivo* resultan ser muy eficaces para su mantenimiento en laboratorio (Bonifassi y Neves, 1990; Poinar, 1990; Deseo *et al.*, 1990). En contraposición, los métodos *In vitro* ofrecen mayores ventajas en cuanto a la economía de calidad, ya que

los entomonemátodos son criados en medios homogéneos, reproducibles y la economía del proceso es altamente dependiente de la consistencia de la producción, aunque el proceso puede verse afectado por la contaminación del medio. No obstante, se obtienen beneficios hasta un nivel de producción de  $10 \times 10^{12}$  entomonemátodos/mes, de acuerdo a lo establecido por Friedman (1990); Gaugler y Georgis (1991)

El almacenamiento en suelo de los juveniles infectivos resulto efectivo, no se afectó la patogenicidad de los entomonemátodos, ni se presentó contaminación por otros patógenos, sin embargo, la recuperación de los J3 para pruebas de patogenicidad fue baja, posiblemente debida a la agregación y poca actividad de los entomonemátodos en estas condiciones de almacenamiento. Igualmente, otros factores del suelo que afectan los entomonemátodos son el tamaño del poro, agua, aireación, producción de metabolitos tóxicos por microorganismos o depredación por invertebrados. Kaya (1990), observa mejor sobrevivencia de juveniles infectivos en suelos esterilizados que en suelos no esterilizados, estableciendo que la muerte de macro y microorganismos en suelos esterilizados probablemente incrementan la sobrevivencia de los Steinernematidos. Por otra parte, la temperatura de 8°C no afectó la sobrevivencia de los entomonemátodos durante los seis meses de almacenamiento, esto se evidenció por la posición recta o enrollada que toman los J3. El enrollamiento posiblemente está relacionado con el proceso de anhidrobiosis descrito por Womersley (1990).

Finalmente se puede señalar lo siguiente:

- Las cosechas diarias de juveniles infectivos en los diez primeros días de producción, posibilitan en un 90% la obtención de J3 vivos para su posterior utilización.
- El número de infectivos producidos por un hospedero depende del tamaño, especie, susceptibilidad y tiempo tomado por el complejo entomonemátodo/bacteria para ocasionar muerte al hospedero.
- La concentración de cualquier suspensión de juveniles infectivos es determinante para el almacenamiento; por ello, concentraciones bajas de entomonemátodos posibilitan la viabilidad y conservación de la infectividad por largos períodos de almacenamiento.
- La producción *In vivo* de juveniles infectivos, es indispensable para la recuperación, extracción y mantenimiento de un «Stock» de entomonemátodos en laboratorio y desarrollo de diferentes ensayos de investigación.  
Para una producción de juveniles infectivos a gran escala, se recomienda utilizar cultivos líquidos monoxénicos.
- El almacenamiento en suelo de juveniles infectivos no es viable, ya que no permite la obtención de entomonemátodos rápidamente, además la esterilización y/o pasteurización del suelo, afectan posiblemente la composición física y alteran su humedad, siendo esta última, un factor limitante para los juveniles infectivos. Por lo tanto, es necesario desarrollar estudios que evalúen diferentes substratos, que permitan almacenar concentraciones altas de J3, sin que se afecte su viabilidad o patogenicidad.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra P. Stock, curadora de la colección nematológica de la UCDAVIS, California, por su continua asesoría en el desarrollo de este trabajo, y a CINDEC por su apoyo económico para esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- AKHURST, R.J. y DUNPHY, G.B. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect host. En: Parasites and Pathogens of insects, Vol 2: Pathogens (Beckage, N. E., Thompson, S.E. y Federici, D.A. Eds.). Academic Press. New York. P. 1-23. 1993.
- BONIFASSI, M. y NEVES, J. La production des Nematodes entomopathogenes: Steinernematidae et heterorhabditidae. Recontres Caribes en Luttle Biologique, Guadalupe. Francia. INRA. Les Colloques N 58. 1990.
- DESEO, K.V., RUGGERI, L. y LAZZARI, G. Mass production and quality control of entomopathogenic nematodes in *Galleria mellonella* (L) larvae. En: International Colloquium of invertebrate Pathology, 5th Adelaide. Proceedings. p 250. 1990.
- DUTKY, S.R., THOMPSON, J.V. y CANTWELL, G.E. A technique for mass propagation of the DD-136 nematode. Journal of Insect Pathology 6: 417-422. 1964.
- FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler, R. y Jaya, H.K. Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. p 153-172. 1990.
- GARZON, M. y AZA, B. Potencial del nematodo (*Steinernema* sp) para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hust). Tesis Ing. Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. 110 pp. 1994.
- GAUGLER, R. y GEORGIS, R. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). Biological Control 1: 269-274. 1991.
- GEORGIS, R. Formulation and application technology. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R. y Jaya, H.K. Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. p 173-191. 1990.
- GLASER, R.W. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science 73: 614-615. 1931.
- KAYA, H. Soil ecology. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R., Jaya, H.K. Eds). CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 93-115. 1990.
- KAYA, H.K. y GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38: 181-206. 1993.
- McCOY, E.E. y GIRTH, H.B. The culture of *Neoapectana glaseri* on veal pulp. Journal of Agriculture 385:1-12. 1938.
- NGUYEN, K.B. y SMART, G.C. Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* to selected invertebrates. Journal of Nematology 23(1): 7-11. 1991.
- POINAR, G.O.Jr. Nematodes for biological control of insects. Boca Raton. CRC Press. 227 pp. 1979.
- POINAR, G.O.Jr. Taxonomic and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R. y Kaya, H.K. Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 23-61. 1990.
- SAENZ, A.A. *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae) ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias, área de énfasis Entomología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá. 125 pp. 1998.
- SAENZ, A.A. Evaluación de procedimientos para el aislamiento y almacenamiento del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). Revista Colombiana de Entomología 25(3-4): 209-215. 1999.
- SAENZ, A.A. y LUQUE, J.E. Ciclo de vida del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae* Filipjev. Agronomía Colombiana 17:15-25. 2000.
- STOCK, P. Sistemática y Biología de nemátodos parásitos y asociados a insectos de importancia Económica. Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santafé, Argentina. P. 61-62. 1998.
- WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303. 1927.
- WOMERSLEY, C.Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R., Jaya, H.K. Eds). CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 120- 140. 1990.
- WOODRING, J.L. y KAYA, H.K. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Techniques Suthem Cooperative. Series Bulletin 331. Arkansas. Agricultural. 30 pp. 1988.