

## Patogenicidad de nematodos entomopatógenos nativos sobre dos moscas de importancia agrícola en Venezuela

### Pathogenicity of native entomopathogenic nematodes on two flies of agricultural importance in Venezuela

Ligia Carolina Rosales<sup>1\*</sup>, Renato Crozzoli<sup>2</sup>, Liliana Puente<sup>1</sup>, Eutimio González<sup>3</sup>, Ana Castillo<sup>3</sup>, Pedro Morales<sup>1</sup>, Mayra Rodríguez H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA CENIAP), Maracay, Venezuela. <sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO), Instituto Zoológico Agrícola. <sup>3</sup>UCV-FAGRO, Instituto Química Agrícola, Maracay, Venezuela. <sup>4</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorio Nematología, San José de las Lajas, Cuba.

\*Correo electrónico: carolina.rosalesa@gmail.com

#### RESUMEN

Los cultivos de frutas y hortalizas son afectados por insectos plaga que disminuyen la producción o la calidad. El uso de nematodos entomopatógenos surge como una alternativa de control, por su inocuidad al ambiente y fácil utilización. Para conocer la potencialidad de cepas venezolanas, se evaluó la patogenicidad de tres cepas nativas de nematodos entomopatógenos sobre dos plagas de interés agrícola en el país. Se efectuaron bioensayos con las cepas INIA-4, INIA-9 e INIA-11. Se inocularon fases larvales de *Anastrepha obliqua* y *Bradysia difformis*. Se aplicaron cinco dosis de cada cepa (100; 400; 800; 1.200 y 1.600 JI/mL) y se determinó la mortalidad de los insectos a las 24; 48 y 72 h. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por el método no paramétrico de Kruskal-Wallis y las medias con la prueba de comparaciones por pares ( $P < 0,05$ ). Para calcular la  $DL_{50}$  se efectuó un análisis probit. Todas las cepas exhibieron patogenicidad. En larvas del último instar de *A. obliqua* (Cepa INIA-9) se obtuvo una mortalidad del 100% con las dosis de 80 JI/mL y superiores. El análisis Probit indica que la Cepa INIA-11 presentó la  $DL_{95}$  más baja con un valor de 28,00 JI/mL para *A. obliqua*; seguida de la cepa INIA-9 con 57,01 JI/larva para *B. difformis*. Los resultados obtenidos evidencian la potencialidad de estos organismos como controladores biológicos de las plagas señaladas, que puede ser reproducido de forma masiva y utilizarse como una alternativa dentro de un programa de Manejo integrado de plagas.

**Palabras clave:** control biológico, *Fungus gnat*, *Heterorhabditis*, manejo integrado de plagas.

Recibido: 18/04/16 Aprobado: 15/11/16

#### ABSTRACT

Fruit and vegetable crops are affected by pest insects that reduce production or quality. The use of entomopathogenic nematodes emerges as an alternative control due to its innocuousness to the environment and its easy use. In order to know the potential use of Venezuelan strains, the pathogenicity of three native strains of entomopathogenic nematodes was evaluated on two pests of agricultural interest in the country. Bioassays were carried out using the INIA-4, INIA-9 and INIA-11 strains. Larval stages of *Anastrepha obliqua* and *Bradysia difformis* were inoculated. Five doses of each strain were applied (100, 400, 800, 1,200 and 1,600 JI / mL) and insect mortality was determined at 24, 48 and 72 h. Statistic analyses were performed using the Kruskal-Wallis non parametric test and the pair wise comparison test. A Probit analysis was used in order to calculate the LD50. All strains exhibited pathogenicity. Total mortality was obtained in the last instar larvae of *A. obliqua* (INIA-9 strain) at 80 JI / mL and higher dose. The Probit Analysis indicates that the INIA-11 strain presented the lowest LD95 value of 28.00 IJ / mL for *A. obliqua*; followed by the INIA-9 strain with 57.01 IJ/larvae for *B. difformis*. The results obtained show the potential use of the mentioned nematodes as a biological control over the indicated pests. It also offers a native microorganism that can be massively reproduced and used within an integrated pest management program.

**Key words:** biological control, *Fungus gnat*, *Heterorhabditis*, integrated pest management.

## INTRODUCCION

En Venezuela, para el control de insectos plagas en los cultivos se usan numerosos productos químicos. Estos, aplicados en exceso pueden alterar el equilibrio ambiental, causar la aparición de resistencia en los insectos plaga y desequilibrar las poblaciones de artrópodos beneficiosos. Situación compleja que propicia un incremento en la demanda de otras alternativas de manejo selectivo y menos agresivas al ambiente (García y Zambrano 2007).

Los cultivos de frutas y hortalizas no escapan a esa situación. Estos son afectados por numerosas plagas que requieren ser controladas. La producción de esos rubros se dirige al consumo fresco, principalmente; por esto, las regulaciones sobre límites de residuos permitidos son un factor determinante para la comercialización. Pérez *et al.* (2013) reportan que en evaluaciones de hortalizas hasta el 50% presentaron residuos químicos. Esto representa un riesgo a la salud humana y refuerza la necesidad de usar alternativas diferentes al control químico.

Entre las plagas más comunes de frutas y hortalizas están las moscas. La mosca del mango *Anastrepha obliqua* Mcquart (Diptera:Tephritidae) constituye una limitante al cultivo del mango. Se reportan pérdidas de hasta 30% por los daños que causan las fases larvales, de *A. obliqua*, al alimentarse de la pulpa del fruto. Los adultos, generalmente, no producen daño (Barranco 2003). La mosca negra, *Bradysia difformis* Frey, 1948 (Diptera:Sciaridae), en su fase larval, causa estragos en semilleros de hortalizas, frutales y en plantas ornamentales porque se alimenta de las raíces e impide el apropiado desarrollo de las mismas (Villanueva *et al.* 2013)

Los nematodos entomopatógenos se utilizan en el manejo de plagas, con demostrada eficacia, en diversos países (Sánchez 2002; López-Nuñez 2006; Quintero *et al.* 2012; Stock y Goodrich 2012). En el mercado venezolano son insuficientes los productos a base de estos nematodos y es necesario aumentar la producción como valiosos biorreguladores. Aun cuando existen trabajos precedentes de aislamiento, diagnóstico y evaluación de nematodos entomopatógenos (Rosales y Suárez 1998; Xuejuan *et al.* 2000;

San Blas *et al.* 2015), en el país, no es común el uso por la poca disponibilidad comercial.

El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de tres cepas nativas de nematodos entomopatógenos sobre dos plagas de interés agrícola. Se pretende obtener cepas seleccionadas de comprobada efectividad para el desarrollo masivo de productos a base de nematodos entomopatógenos para uso agrícola en Venezuela.

## MATERIALES Y METODOS

### Mosca del mango (*A. obliqua*)

Para el estudio fueron utilizadas las cepas nativas: INIA-4, INIA-9 e INIA-11, todas colectadas en Venezuela. Se utilizaron larvas de *A. obliqua* de una población silvestre provenientes de frutos de mango colectados en la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV), Maracay. Se evaluó la mortalidad de las larvas cuando se encontraban en sus dos últimos instares; esto corresponde con el momento en que salen las larvas de los frutos y caen al suelo y son susceptibles de ser atacadas por los nematodos.

**Bioensayo 1.** En placas Petri de 6 cm de diámetro, forradas internamente con papel de filtro, se colocó 1 mL de suspensión de cada una de las cepas: INIA-4, INIA-9 e INIA-11, que contenía 100; 400; 800; 1.200 y 1.600 juveniles infectivos (JI)/mL. Luego se colocaron 10 larvas por placa, se sellaron con parafilm incubaron a 28°C y se registró la mortalidad a las 24; 48 y 72 h. Se realizaron 15 repeticiones/tratamiento más cinco placas testigo, que se asperjaron con agua destilada estéril.

**Bioensayo 2.** Se prepararon las unidades experimentales en envases plásticos que contenían 300 cm<sup>3</sup> de suelo estéril. Posterior a la inoculación de los JI de nematodos se colocaron 10 larvas de moscas del último instar. Cada tratamiento se replicó 10 veces y los envases se distribuyeron al azar en el umbráculo de Protección Vegetal del INIA-CENIAP, con una temperatura promedio de 32±3,2°C y una HR de 72%.

La concentración de JI fue la recomendada por Toledo *et al.* (2006), de 125 JI/cm<sup>2</sup> aplicados a

la superficie del sustrato en los envases. Las evaluaciones se efectuaron a los 2; 4; 6 y 8 días después de la inoculación, cuando los envases se transportaron al laboratorio. El sustrato se tamizó para ubicar las larvas y pupas con síntomas de parasitismo, las cuales fueron colocadas en placas Petri y disectadas para confirmar la presencia de nematodos.

### **Mosca Negra o Fungus gnat (*Bradysia difformis*)**

En este caso se usaron dos cepas INIA-9 e INIA-11. Se utilizaron larvas de tercer y cuarto instar de una población silvestre de *B. difformis* que causan daños a las raíces de plantas. Las larvas provienen de raíces de plántulas de pimentón, sembradas en bandejas de germinación dentro de casas de cultivo del estado Aragua.

**Bioensayo 3.** En placas Petri de 6 cm de diámetro, forradas internamente con papel de filtro, se colocó 1 mL de suspensión de cada una de las poblaciones, que contenía 100; 400; 800, 1.200 y 1.600 JI/mL. Se colocaron 10 larvas/placa. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C. Se determinó la mortalidad a las 24; 48 y 72 h. Se realizaron 15 repeticiones/tratamiento, más cinco placas testigo con agua destilada estéril.

La mortalidad se determinó con observación de los síntomas típicos de inmovilidad del insecto, detención de la alimentación, cambio de coloración y con una disección de los insectos al sexto día de la inoculación.

Para todas las pruebas, la comparación de mortalidad entre aislamientos se realizó con el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de comparación de pares (Statistix 8.0).

Se calculó la  $DL_{50}$  y  $DL_{95}$ , con el análisis Probit, programa INISAV (2001).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Potencialidad de las poblaciones seleccionadas como biorreguladoras de dos insectos plaga de importancia en Venezuela.

### **Mosca del mango *A. obliqua***

Las tres cepas evaluadas sobre las larvas de *A. obliqua* causaron parasitismo. No se detectaron diferencias significativas en la mortalidad, lo cual indica similar efectividad de las tres contra este insecto (Cuadro 1).

Con respecto a la acción individual de cada una de las cepas, si se observaron diferencias significativas. INIA-4 e INIA-11 causaron altos valores de mortalidad en larvas de *A. obliqua* con las dosis de 100 y 400 JI/mL, con promedios de mortalidad de 76 y 90%, respectivamente y de 100% con las dosis  $\geq$  800 JI/mL. La cepa INIA-9 logró el 100% de mortalidad con una dosis de 1.200 JI/mL. La cepa INIA-11 presentó diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo en la dosis más baja. Las otras cepas mostraron diferencias significativas con relación al testigo a partir de la dosis de 100 JI/mL, tal como se detalla en el Cuadro 2.

A partir de la dosis de 400 JI/mL las cepas en estudio presentaron un comportamiento similar. Asimismo, se observa que la cepa INIA-11 obtuvo 100% de mortalidad a las 48 h con la dosis de 1.200 JI/mL, mientras que, la cepa INIA-4 se obtuvo con la dosis de 1600 JI/mL. La cepa INIA-9 necesitó 72 h para alcanzar 100% de mortalidad.

Cuadro 1. Valores promedios y total de mortalidad para larvas de *A. obliqua* a las 72 h de inoculación *in vitro*, con tres cepas de nematodos entomopatógenos.

Cepas de nematodos entomopatógenos	Promedio de larvas muertas por placa Petri	Total general de larvas muertas	Mortalidad (%)
INIA-4	7,16 $\pm$ 4,09 a	645	86,00
INIA-9	7,78 $\pm$ 3,55 a	701	93,46
INIA-11	8,12 $\pm$ 3,60 a	731	97,46

Los valores señalados con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de comparación por pares ( $P > 0,05$ )

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *A. obliqua* entre 24 y 72 horas con diferentes concentraciones de tres cepas de nematodos entomopatógenos.

Concentración Juveniles Infecciosos/mL	Mortalidad (%)								
	Cepa INIA - 4			Cepa INIA- 9			Cepa INIA - 11		
	Horas			Horas			Horas		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
0	2a	2a	2a	2a	3a	3a	0a	1a	2a
100	2a	24b	34a	24b	32b	76b	40b	80b	90b
400	20b	72c	94b	46bc	66b	90bc	54b	78b	94b
800	40b	88c	100b	62c	72b	98c	62bc	94bc	100b
1200	72c	92bc	100 b	68c	90c	100c	80c	100c	100b
1600	64c	100 c	100b	70 c	92 c	100c	88c	100c	100b

Los valores señalados con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de comparación por pares ( $P>0,05$ ).

Es importante resaltar, que el análisis Probit es usado comúnmente para evaluar productos cuyo ingrediente activo es una molécula química. Cuando se trabaja con organismos vivos, el análisis Probit permite hacer una aproximación al comportamiento de estos organismos, al incrementar la dosis de aplicación. Siempre van a intervenir un sin número de variables externas y otras intrínsecas de los nematodos entomopatógenos. La interacción de esas variables es la que determinará la acción final de los nematodos en el bioensayo. Aunado a esto, influye la procedencia de la plaga a evaluar, bien sea de una cría estandarizada de laboratorio o de una población silvestre, donde hay más heterogeneidad del material de trabajo en cuanto a edad y procedencia genética.

Reyes (2003) evaluó en larvas de tercer estadio de *Anastrepha luden* Loew, la dosis de 2.000 JI/mL y obtuvo los siguientes valores de mortalidad: *Heterorhabditis indica* 71,13%; *Steinernema carpocapsae* cepa All 51,2%; *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 47,9% y *Steinernema riobrave* 38,6%.

En un estudio de la infectividad de *H. bacteriophora* al tercer instar de *Anastrepha serpentina* Wiedemann, bajo condiciones de laboratorio, Toledo *et al.* (2006) encontraron que se requieren dosis de 36 JI/cm<sup>2</sup> para alcanzar 50% de mortalidad; así como, valores cercanos a los 700 JI/cm<sup>2</sup> para obtener 90% de mortalidad,

lo que se considera un nivel significativo de control de esta plaga. Igualmente, Heve *et al.* (2016) lograron control de larvas y pupas de *Anastrepha suspensa* con dosis de 200 JI/mL en condiciones de laboratorio.

Otra especie de mosca de fruta, estrechamente relacionada, *Ceratitits capitata* Wiedemann, 1824 (Diptera: Tephritidae), se ha controlado con estos nematodos obteniéndose desde 33,8 hasta 98,5% de efectividad, al asperjar 50 JI/pupa o 100 JI/larva (Da Silva *et al.* 2009; Rhode 2010; De Minas *et al.* 2011). Los autores evidenciaron que los nematodos entomopatógenos tienen amplio rango de acción; en todos los casos hay un porcentaje de mortalidad que contribuye a la reducción de la plaga.

Con respecto al análisis Probit se encontró el valor más bajo de DL<sub>50</sub> en la cepa INIA-11 con 0,04 JI/mL, seguido de INIA-9 con 2,91 JI/mL e INIA-4 con DL<sub>50</sub> de 26,73 JI/mL (Cuadro 3).

Los intervalos de confianza de las tres cepas se solapan para cada una de estas; por lo que, se puede asumir que la misma dosis utilizada para lograr una mortalidad de 50% de la población, servirá para provocar la muerte del 95% de la plaga evaluada. En las Figuras 1, 2 y 3 se observa la representación gráfica de la mortalidad de cada cepa en función de la concentración de aplicación. Por la pendiente de la recta, en estas, se evidencia que la cepa

INIA-11 ejerce una acción más virulenta y rápida a menor concentración, seguida de INIA-9.

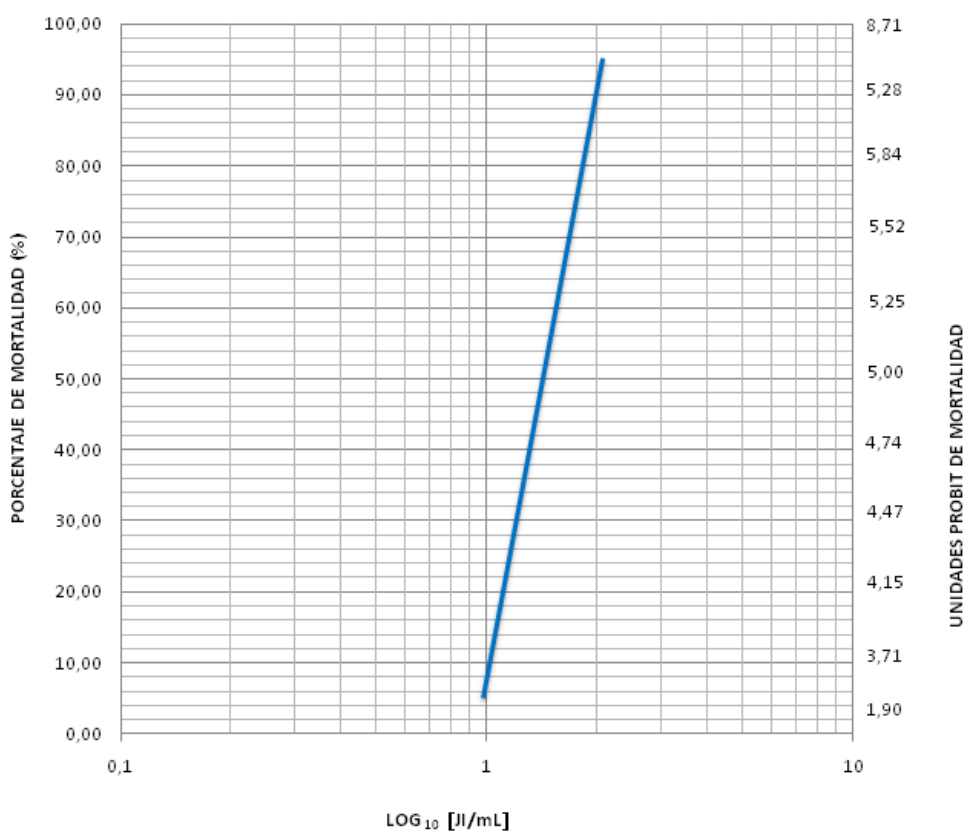
Toledo et al. (2009) utilizaron *S. carpocapsae* asperjado en arena que contenían larvas de *A. obliqua* del último instar y obtuvieron una DL<sub>50</sub> de 157 IJ/cm<sup>2</sup>. Barbosa-Negrisoni et al. (2009) evaluaron *H. bacteriophora* Poinar RS88 y *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston RS59, sobre larvas del último instar de *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera:Tephritidae) encontrando DL<sub>90</sub> de 1630; 457 y 2851; 423 JI/cm<sup>2</sup>, respectivamente, para los dos nematodos mencionados previamente.

Foekel et al. (2016) encontraron valores de DL<sub>50</sub> de 96.3 y DL<sub>90</sub> de 314 para *A. obliqua*. En el uso

Cuadro 3. Valores del análisis Probit, para *A. obliqua* inoculadas con tres cepas de nematodos entomopatógenos.

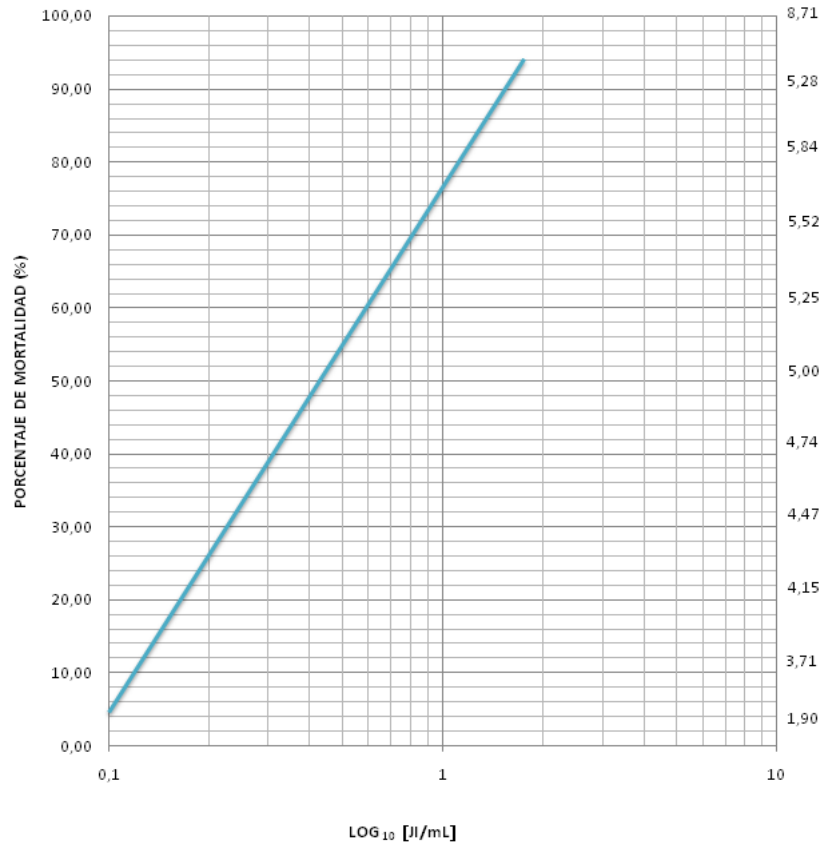
Análisis Probit	Cepas de nematodos entomopatógenos		
	INIA - 4	INIA-9	INIA-11
DL <sub>50</sub>	26,73	2,91	0,04
Límites de Confianza	9,24-89,26	0 - 48,90	0 - 19,94
DL <sub>95</sub>	78,82	57,01	28,00
Límites de Confianza	14,19-180,01	8,42-473,79	0 - 72,16
X <sup>2</sup>	0,25	3.114	0,028

DL= dosis letal. X<sup>2</sup>= Chi cuadrado de heterogeneidad



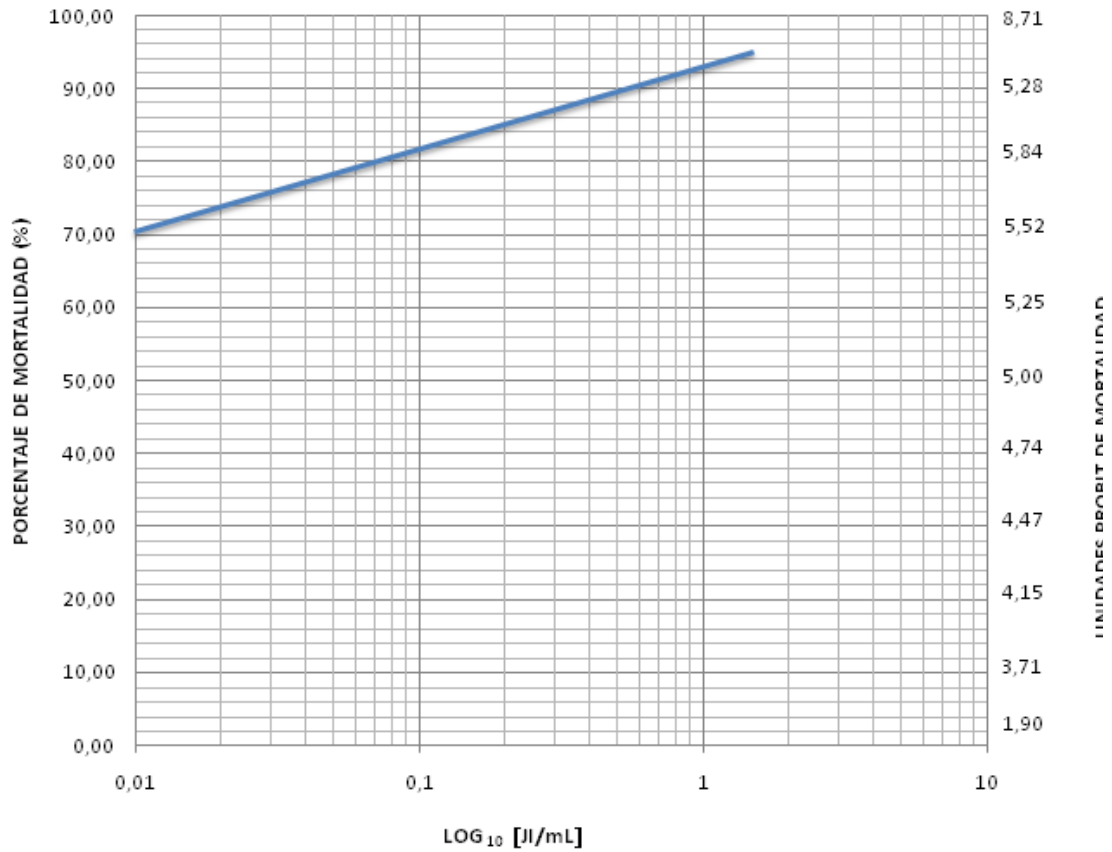
Selección	Probit 3,35 (CL <sub>5</sub> )	Probit 5,00 (CL <sub>50</sub> )	Probit 6,64 (CL <sub>95</sub> )	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
S <sub>0</sub>	9,06	26,73	78,82	y= 0,0029 + 3,502 [Log <sub>10</sub> X]	0,8621

Figura 1. Representación gráfica de la tendencia en la respuesta de mortalidad acumulada a las 72 h (Unidades Probit y Unidades Porcentuales) para larvas de *A. obliqua* (Macquart) correspondiente a la S<sub>0</sub> en función de la acción de una mezcla acuosa contentiva de diferentes concentraciones [JI/mL] de *Heterorhabditis indica*, cepa INIA- 4



Selección	Probit 3,35 (CL <sub>5</sub> )	Probit 5,00 (CL <sub>50</sub> )	Probit 6,64 (CL <sub>95</sub> )	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
S <sub>0</sub>	0,15	2,91	57,01	y= 4,4084 + 1,2734[Log <sub>10</sub> X]	0,9430

Figura 2. Representación gráfica de la tendencia en la respuesta de mortalidad acumulada a las 72h (Unidades Probit y Unidades Porcentuales) para larvas de *A. obliqua* (Macquart) correspondiente a la S<sub>0</sub> en función de la acción de una mezcla acuosa contentiva de diferentes concentraciones [JI/mL] de *Heterorhabditis* sp; cepa INIA - 9



Selección	Probit 3,35 (CL <sub>5</sub> )	Probit 5,00 (CL <sub>50</sub> )	Probit 6,64 (CL <sub>95</sub> )	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
S <sub>0</sub>	0,00	0,04	28,00	y= 5,8006 + 0,5838[Log <sub>10</sub> X]	0,5312

Figura 3. Representación gráfica de la tendencia en la respuesta de mortalidad acumulada a las 72 h (Unidades Probit y Unidades Porcentuales) para larvas de *A. obliqua* (Macquart) correspondiente a la S<sub>0</sub> en función de la acción de una mezcla acuosa contentiva de diferentes concentraciones [JI/mL] de *Heterorhabditis* sp; cepa INIA-11

de envases con suelo simula el hábitat natural de la plaga, con lo que se obtienen datos más cercanos a lo que ocurre en la naturaleza.

Se aprecia que existe una gran variabilidad en los niveles de inóculo utilizados para alcanzar niveles similares de mortalidad, por lo que se reitera la importancia de evaluar en cada caso, la especie del insecto con la cepa del nematodo. Los datos de investigaciones previas siempre van a ser referenciales, más no determinantes, al momento de decidir cuál especie de nematodo o cuál dosis utilizar en una situación particular.

En el bioensayo 2, en envases con arena, las cepas evaluadas presentaron parasitismo sobre las larvas de *A. obliqua*, y la mayor mortalidad fue causada por INIA-9 aunque sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a INIA-11 (Cuadro 4). En este bioensayo se evidenció que los valores de mortalidad fueron menores a los obtenidos *in vitro* para la misma especie, similar a lo obtenido por Chaneiko *et al.* (2015).

Barbosa *et al.* (2009) encontraron una reducción en la efectividad de la acción de los nematodos entomopatógenos, al ser evaluados en condiciones de umbráculo. Los experimentos en invernadero no mostraron diferencias en la mortalidad con cualquiera de los nematodos, y en el campo, *H. bacteriophora* RS88 y RS59 y *S. riobravae*, rociadas individualmente sobre la fruta natural y artificialmente infestados, obtuvieron una mortalidad de 51,3%, 28,1% y 20%, 24,3%, respectivamente.

Toledo *et al.* (2009) evaluaron la acción de *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* sobre larvas de *A. obliqua* inoculadas en envases con arena y encontraron mortalidades entre 60 y 82%, valores que variaban dependiendo del tipo de suelo logrando la mayor mortalidad en suelos areno-arcillosos. Estos valores son equivalentes a los encontrados para este bioensayo con inoculación de las larvas directamente en el suelo.

#### **Mosca negra o Fungus gnat (*Bradysia difformis*)**

La evaluación de dosis de nematodos entomopatógenos contra la mosca negra es un paso crucial para determinar la más adecuada, de manera que sea efectiva y que represente un menor costo para el productor (Martins 2010), por ser una plaga asociada a cultivos de alto valor comercial. Al evaluar las dos cepas de nematodos entomopatógenos no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y ambas poblaciones, INIA-9 e INIA-11, causaron mortalidad de las larvas de *B. difformis* (Cuadro 5).

La evaluación de diferentes concentraciones de nematodos entomopatógenos sobre *B. difformis* evidenciaron diferencias significativas con relación al control en todas las concentraciones evaluadas, excepto en el caso de la población INIA-9 en la concentración de 100 JI/mL. Se obtuvieron valores de mortalidad por encima de 90% con las concentraciones de 1.600 JI/mL en ambas poblaciones y la de 1.200 JI/mL en la población INIA-9. En el caso de la población

Cuadro 4. Valores porcentuales de mortalidad para larvas de *A. obliqua* en cuatro fechas inoculadas con tres poblaciones de nematodos entomopatógenos en condiciones de umbráculo.

Cepas de nematodos entomopatógenos	Mortalidad (%)			
	días			
	2	4	6	8
Testigo	0 a	3,2 a	7,2 a	9,2a
INIA-4	31,2 a	48,8 b	62,4 b	63,2b
INIA-9	62,4 b	71,6 c	74,8bc	85,2c
INIA-11	58,0 b	63,6 c	64,8c	74,8c

Los valores señalados con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de comparación por pares ( $P > 0,05$ ).



Cuadro 5. Valores promedios y totales de mortalidad para larvas de *Bradysia difformis* a las 72 h de inoculación *in vitro* con dos poblaciones de nematodos entomopatógenos.

Cepas de nematodos entomopatógenos	Promedio de larvas muertas por placa Petri	Total general de larvas muertas	Mortalidad (%)
INIA-9	6,66 ± 3,28 a	597	79,6
INIA-11	7,10 ± 3,42 a	639	85,2

Los valores señalados con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de comparación por pares ( $P > 0,05$ )

INIA-11, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí con el testigo (Cuadro 6).

En pruebas de laboratorio Hyeong *et al.* (2001), evaluaron *S. carpocapsae* sobre todas las fases inmaduras de *fungus gnat* y reportaron que las más sensibles son las larvas de tercero y cuarto instar, con una mortalidad de 35%. Martins (2010), al evaluar *H. indica* en condiciones de laboratorio logró una mortalidad de 96% y

Cuadro 6. Valores porcentuales de mortalidad acumulada de larvas de *B. difformis* 72 h después de la aplicación de diferentes concentraciones de dos poblaciones de nematodos entomopatógenos.

Concentración JI/mL	Mortalidad (%)	
	Cepas de nematodos entomopatógenos	
	INIA-9	INIA-11
0	10 a	8 a
100	52 ab	72 b
400	74 bc	80 b
800	88 bc	86 b
1200	90 c	86 b
1600	90 c	94 b

Los valores señalados con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de comparación de pares ( $P > 0,05$ ).

Villanueva (2013) obtuvo mortalidades *in vitro* en un rango de 60 – 100% de larvas y pupas de *B. difformis* inoculadas conjuntamente con *H. bacteriophora* y *S. feltiae*.

Al efectuar el análisis Probit los resultados muestran diferencias en la virulencia de las cepas evaluadas contra *B. difformis*. La  $DL_{50}$  para INIA-9 fue de 13,17 mientras que para INIA-11 fue de 1,75; cinco veces menor (Cuadro 7).

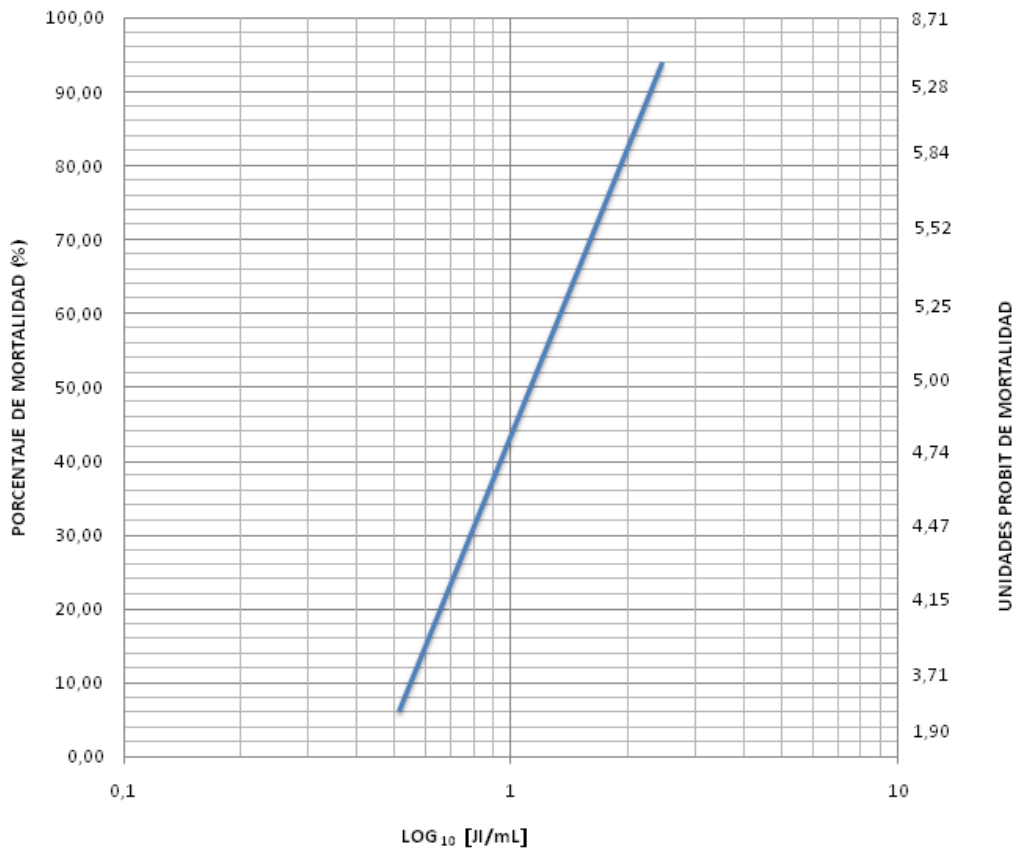
Teóricamente, en este caso sería la cepa a seleccionar para ser aplicada ya que se requeriría menos cantidad de material biológico para causar 50% de mortalidad. Sin embargo, al analizar la  $DL_{95}$ , ocurre lo contrario, la cepa INIA-9 presenta el menor valor (306,86 JI/mL). En general estos microorganismos deben ser aplicados en grandes cantidades para que la acción que ellos ejercen pueda ser evidenciada a nivel de campo. Esta prueba permite orientar la toma de decisiones sobre la concentración definitiva del inóculo de nematodos a aplicar.

En las Figuras 4 y 5, se observa la representación gráfica de la tendencia de la mortalidad en

Cuadro 7. Valores del Análisis Probit, para *Bradysia difformis* inoculadas con dos cepas de nematodos entomopatógenos.

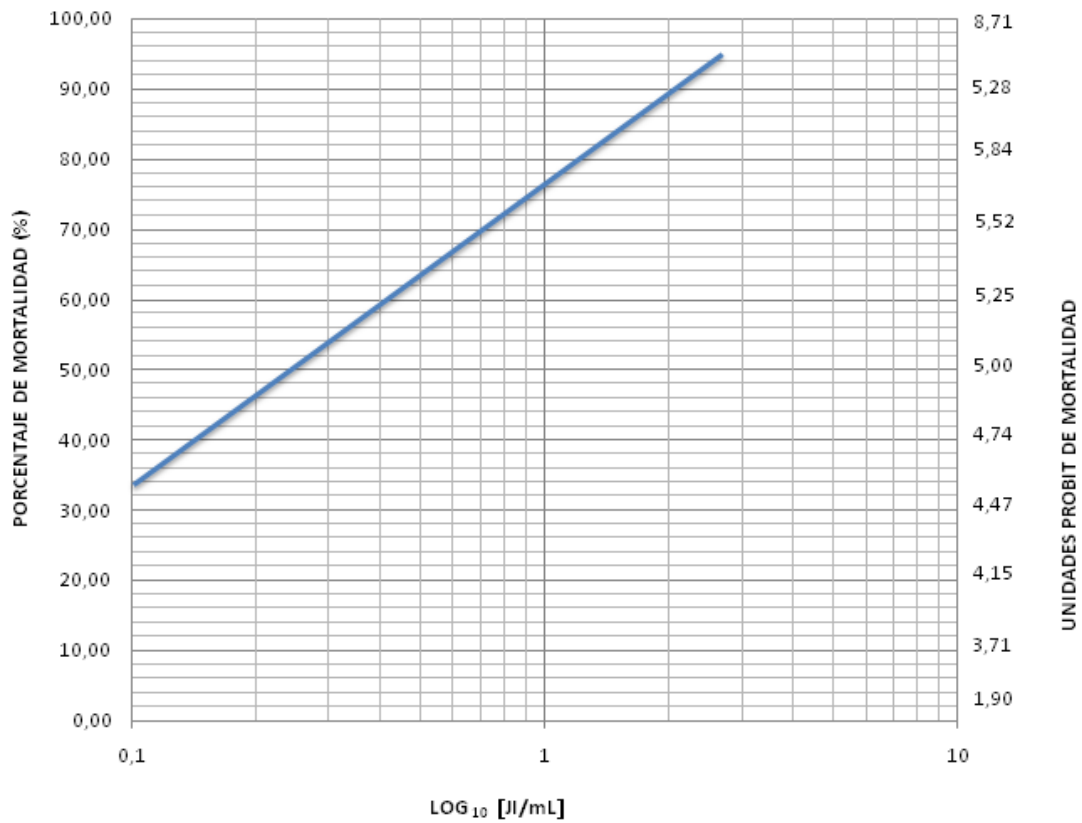
Análisis Probit	Cepas de nematodos entomopatógenos	
	INIA-9	INIA-11
$CL_{50}$	13,17	1,75
Límites de Confianza	8,74-49,41	1,48-20,19
$CL_{95}$	306,86	464,04
Límites de Confianza	248,03-928,54	37,99-548,81
$X^2$	0,033	0,031

$CL_{50}$ : Concentración letal media;  $CL_{95}$ : Concentración Letal al 95%;  $X^2$ : Chi cuadrado de heterogeneidad



Selección	Probit 3,35 (CL <sub>5</sub> )	Probit 5,00 (CL <sub>50</sub> )	Probit 6,64 (CL <sub>95</sub> )	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
S <sub>0</sub>	0,56	13,17	306,86	y= 3,6535 + 1,2029[Log <sub>10</sub> X]	0,7740

Figura 4. Representación gráfica de la tendencia en la respuesta de mortalidad acumulada a las 72h (Unidades Probit y Unidades Porcentuales) para larvas de *Bradysia difformis* correspondientes a la S0 en función de la acción de una mezcla acuosa contentiva de diferentes concentraciones [JI/mL] de *Heterorhabditis* sp. , Cepa INIA -9.



Selección	Probit 3,35 (CL <sub>5</sub> )	Probit 5,00 (CL <sub>50</sub> )	Probit 6,64 (CL <sub>95</sub> )	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
S <sub>0</sub>	0,01	1,75	464,04	y= 4,8348 + 0,6788 [Log <sub>10</sub> X]	0,8235

Figura 5. Representación gráfica de la tendencia en la respuesta de mortalidad acumulada a las 72h (Unidades Probit y Unidades Porcentuales) para larvas de *Bradysia difformis* correspondiente a la S<sub>0</sub> en función de la acción de una mezcla acuosa contentiva de diferentes concentraciones [JI/mL] de *Heterorhabditissp.*, Cepa INIA-11.

función de la dosis utilizada, y se evidencia que la cepa INIA-11 es más efectiva en ejercer su acción parasitaria, aun cuando, las dos cepas logran alcanzar un alto porcentaje de mortalidad.

Gouge y Hague (1995) evaluaron el ciclo de *Steinernema feltiae* en *B. difformis paupera* Tuomikoski, encontraron que a las 45 h ya se había completado una generación del nematodo y el cadáver de las larvas se había desintegrado totalmente. Esto difiere de lo observado en este ensayo, donde las dos poblaciones evaluadas conservaron intacto el cadáver de las larvas hasta las 72 h.

Harris *et al.* (1995) realizaron ensayos en invernaderos y evaluaron el control de *fungus gnat* sobre *Euphorbia pulcherrima*. Se aplicó *S. feltiae*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, un regulador de crecimiento y diazinón. *S. feltiae* logró un control de la plaga similar al del insecticida. Jagdale *et al.* (2004) usó *S. feltiae* a una dosis de  $2,5 - 5 \times 10^5$  JI/m<sup>2</sup> y se redujo significativamente la incidencia de la plaga. Por su parte, Vanninen (2010) empleó  $1,3 \times 10^6$  JI/m<sup>2</sup> de *S. carpocapsae* en Poinsettia y controló hasta 60% de adultos de *fungus gnat*.

Otras especies de nematodos entomopatógenos evaluadas son *Heterorhabditis marelatus* y *H. bacteriophora* las cuales, a una dosis de  $1,25 \times 10^5$  JI/m<sup>2</sup> en el cultivo de *E. pulcherrima* en invernaderos, controlaron hasta 54% de individuos (Jagdale *et al.* 2007b).

La aplicación de nematodos entomopatógenos para el control de *Bradysia difformis* es una estrategia ampliamente usada en otros países (Georgis *et al.* 2006; Cloyd 2010) y los resultados de estos ensayos sugieren que hay un gran potencial de las cepas venezolanas para el control de esta plaga.

## CONCLUSIONES

Los nematodos entomopatógenos nativos de las Cepas INIA-4, INIA-9 e INIA-11, son efectivos en el control de larvas de *A. obliqua* y *B. difformis*, dípteros de importancia agrícola en Venezuela.

Dosis iguales o superiores a 80 JI/mL pueden ser utilizadas en pruebas *in vitro* para evaluar cepas de nematodos entomopatógenos.

Se confirma la potencialidad de estos organismos para su uso en el control biológico de plagas.

## AGRADECIMIENTO

Al personal del INIA CENIAP, Ing. Agr. Johangel García y Edward Espín por su apoyo en los trabajos de campo y laboratorio. Este trabajo fue financiado por el Proyecto Cuba-Venezuela "Producción de nematodos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas".

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barbosa – Negrisoli, C; García, M; Dolinski, C; Negrisoli, A; Benardi, D; Nava, E. 2009. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. *Journal Invertebrate Pathology* 102: 6-13.
- Barranco V, P. 2003. Dípteros de interés agronómico. Agromicidos plaga de cultivos hortícolas intensivos. *Bol. S.E.A.*, 33: 293 – 30.
- Cloyd, R. 2010. *Fungus gnat*. Management in greenhouses and nurseries. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service- MF 2937: 4 p. [On line]. Consultado 29 ene. 2015. Disponible en <http://www.ksre.ksu.edu>
- Da Silva, A; Batista, A; Leite, L; Tavares, F; Raga, A; Schmidt, F. 2009. Efeito de nematoides Entomopatogênicos na Mortalidade da Mosca-do- Mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do Gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii*. *Nematologia Brasileira*. 34: 31-40.
- De Minas, R.; Dolinski, C; Carvalho, D; de Souza, R. 2011. Controle biológico da mosca-do-mediterraneo *Ceratitis capitata* utilizando nematoides entomopatogênicos em laboratorio. *Scientia Agraria* 2:115-119.
- Foelkel, E; Bittencourt M, L; Voss, M. 2016. Virulence of nematodes against larvae of the south-American fruit fly in laboratory using soil from Porto Amazonas, Paraná,

- Brazil, substrate. *Ciência Rural* 46(3):405-410.
- García, R ; Zambrano, C. 2007. Uso de control biológico en frutales de Venezuela. Editado por INIA Convenio Integral de Cooperación Cuba Venezuela. ISBN 980-12-2418-5. 370 p.
- Georgis, R; Koppenhöfer, AM; Lacey, LA; Bélair, G; Duncan, LW; Grewal, PG; Samish, G; Tan, L; Torr, P; Van Tol, RW. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control *Biological Control*. 38:103–123. Consultado 29 ene. 2015. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.005>
- Gouge, G; Hague, D. 1995. The development of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) in the Sciarid fly *Bradysia difformis paupera* (Diptera: Sciaridae). *Annual Applied Biology* 126:395-401.
- Heve, W; El-Borai, F; Carrillo, D; Duncan, L. 2016. Biological control potential of entomopathogenic nematodes for management of Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* Loew (Tephritidae). Consultado 29 ene. 2015. Disponible en <https://doi.org/10.1002/ps.4447>
- Hyeong, K; Choo, H; Kaya, H; Lee, D; Lee, W; Lee, S; Jeon, H. 2004. *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) as a biological control agent against the fungus Gnat *Bradysia difformis agrestis* (Diptera: Sciaridae) in propagation houses. *Biocontrol Science and Technology* 14:7-12.
- Jagdale, G; Casey, M; Grewal, P; Lindquist, RK. 2004. Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia difformis coprophila*, in floriculture. *Biological Control*. 29: 296 – 305. Consultado 29 ene. 2015. Disponible en [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00164-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00164-6)
- López – Nuñez, JC. 2011. Uso de nematodos entomopatógenos en el manejo integrado de la broca del café: Una herramienta para el beneficio de los caficultores. *En: Experiencias con nematodos entomopatógenos. Retos y oportunidades para América Latina. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). Red de implementación de enemigos naturales para el control de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas de importancia en Iberoamérica COBIHO. Código 111RT0418. ISBN: 978-958-46-1409-4. Pp: 91-100.*
- Martins, F. 2010. Avaliação de nematodídeos entomopatógenos no controle de *Bradysia difformis mabiusi* (Diptera: Sciaridae). Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas). Botucatu – SP, Brasil. 167 p.
- Pérez, MA; Navarro, H; Miranda E. 2013. Resíduos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29(4):45-64.
- Quintero, E; López, I; Kondo, T. 2012. Manejo integrado de plagas como estrategia para el control de lamosca del botón floral del maracuyá *Dasiops inedulis* Steyskal (Diptera: Lonchaeidae). *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 13(1):31-40.
- Rosales, LC; Suárez H, Z. 1998. Evaluación de nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control biológico contra *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de Entomología Venezolana* 13:122-140.
- San-Blas E; Rosales LC; Torres Á. 2015. Entomopathogenic Nematodes in Tropical Agriculture: Current Uses and Their Future in Venezuela. In: Campos-Herrera R. (eds) *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer. Chapter 15:375-402.
- Stock, P; Goodrich, H. 2012. Nematodes parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. In: *Manual of Techniques in*

Invertebrate Pathology Ed. By Lawrence A-Lacey. pp. 373-426.

- Toledo, J; Rasgado, MA; Ibarra, JE; Gómez, A; Liedo, P; William, T. 2006. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in a mango orchard. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:155–162.
- Toledo, J; Trevor W; Pérez, C; Liedo, P; Valle, J; Ibarra, J . 2009. Factores abióticos que afectan la capacidad de infección de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) sobre larvas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Ciencia y Tecnología* 19:887-898.
- Toledo, J; Sánchez, JE; Williams, T; Gómez A; Montoya, P; Ibarra, J. 2014. Effect of Soil Moisture on the Persistence and Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) Against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Larvae. *Florida Entomologist* 97(2):528-533. Consultado 29 ene. 2015. Disponible en <https://doi.org/10.1653/024.097.0225>
- Villanueva-Sánchez, E; Ibañez-Bernal, S; Lomeli-Flores, JR; Valdez-Carrasco, J. 2013. Identificación y caracterización de la mosca negra *Bradysia difformis difformis* (Diptera: Sciaridae) en el cultivo de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) en el centro de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 29(2):363-375.
- Xuejuan, F; Maggiorani, A; Gudiño, S. 2000. Uso de nematodos entomopatogenos como una alternativa en el control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Mérida, Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 44:115 – 118.