

Producción *in vivo* de tres entomonemátodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes

In vivo production of three entomonematodes with two infection systems in two hosts

JUAN PABLO MOLINA ACEVEDO¹, JUAN CARLOS LÓPEZ NÚÑEZ²

Revista Colombiana de Entomología 27(1-2): 73-78 (2001)

Resumen. El uso de entomonemátodos (EN) en control biológico se vislumbra como una herramienta en programas de Manejo Integrado de Plagas. Su producción es limitada y es necesario buscar alternativas de producción *in vivo*, económicas y de fácil implementación, para desarrollar trabajos básicos de comportamiento, patogenicidad y actividad biológica en insectos plaga en laboratorio. En este experimento se evaluó la producción *in vivo* de tres especies de EN (Rhabditida: Steinernematidae) *Steinernema carpocapsae* Brasil, *Steinernema carpocapsae* All strain y *Steinernema cubanum*, en dos hospedantes: *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae) y *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae) y dos sistemas de infección: topical e inyección, con el fin de obtener parámetros de producción para la realización de bioensayos. El diseño fue completamente aleatorio, en arreglo factorial 3x2x2, 12 tratamientos con 10 repeticiones (larvas). Variables como producción diaria y acumulada de estados de EN (J1, J4, hembras y machos/larva) y porcentaje de producción de hospedantes, se evaluaron cada 24 horas, desde emergencia de J1 hasta el agotamiento del hospedante. Los tratamientos *S. carpocapsae* Brasil / topical en *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All strain / inyección en *B. mori* presentaron las mayores producciones acumuladas con 149.258 y 139.756 J1, respectivamente. Así mismo, *S. carpocapsae* All strain en *B. mori*/inyección obtuvo la producción máxima por larva con 395.880 J1. *S. cubanum* no se multiplicó bajo los sistemas de infección en *B. mori*, pero si lo hizo en *G. mellonella*, observándose especificidad por hospedante. *G. mellonella* / topical y *B. mori* / inyección presentaron las producciones mayores de J1, entre el tercer y quinto día, período para realizar las colectas de EN. *G. mellonella* se ratifica como hospedante efectivo; sin embargo, *B. mori* es una alternativa para producción *in vivo* de EN.

Palabras clave: Nemátodos de insectos. Producción *in vivo*. *Galleria mellonella*. *Bombyx mori*. *Steinernema carpocapsae* All strain. *Steinernema carpocapsae* Brasil. *Steinernema cubanum*.

Summary. The use of entomonematodes (EN) as a biological control, is a very valuable tool within an Integrated Pest Management program. The mass production in laboratory is a limiting factor and is necessary to develop studies about behavior, pathogenicity and biological activity on insect pest populations in laboratory, needed to seek an easy and economic alternatives of *in vivo* mass production. This paper describes an *in vivo* production technique of three EN (Rhabditida: Steinernematidae) *Steinernema carpocapsae* Brasil, *Steinernema carpocapsae* All strain and *Steinernema cubanum*, in two insect host: *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) and two infection systems: topical and injection, to standardize parameters of production and to realize pathogenicity proofs. A randomized experimental design in a factorial arrangement 3x2x2, 12 treatments each one composed by ten larvae was evaluated. Daily and accumulative production of EN stages (J1, J4, males and females/larvae) and host production percent were observed every 24 hours, from EN emergency to depletion host. The treatments *S. carpocapsae* Brasil by topical system in *G. mellonella* and *S. carpocapsae* All strain by injection system in *B. mori*, presented the highest accumulative production 149.258 J1/larvae and 139.756 J1/larvae respectively. It also did obtain the highest production for *S. carpocapsae* All strain in *B. mori* by injection system (395.880 J1). *S. cubanum* was not reproduced under any infection system in *B. mori*, but in *G. mellonella*, being an specific host. *G. mellonella* by topical system and *B. mori* by injection system, registered the highest level of production of J1 between third to fifth day after infection time to harvest the EN production. *G. mellonella* is ratified as the most effective host to reproduce EN, however *B. mori* can be used as an alternative of production *in vivo* of EN.

Key words: Entomonematodes. *In vivo* production. *Galleria mellonella*. *Bombyx mori*. *Steinernema carpocapsae* All strain. *Steinernema carpocapsae* Brasil. *Steinernema cubanum*.

Introducción

La efectividad demostrada de los agentes microbianos, como hongos y bacterias, en el control de plagas para la protección de cultivos, el descubrimiento de otros agentes y la implementación de técnicas para su producción, formulación y control de calidad, unidas con la necesidad de minimizar el impacto negativo que causa el uso

de insecticidas en el medio ambiente, han permitido que los insecticidas microbianos se posicionen a un nivel alto en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Lacey y Goettel 1995; Georgis 1997), llegando a ser más competitivos con el control químico tradicional (Georgis 1997). Los entomonemátodos (EN), principalmente de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, representan una parte

importante del espectro de los más recientes biocontroladores, con resultados satisfactorios en el control de insectos plaga habitantes del suelo (Ehlers 1996).

Uno de los principales insectos hospedantes que ha sido probado comúnmente para producción *in vivo*, de numerosas especies de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, es *Galleria mellonella*

1 Estudiante de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Becario Colciencias. E-mail: Juanpablo@molina.as
2 Asistente de Investigación. Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé, Chinchiná, Caldas - Colombia. A.A 2427 Manizales. E-mail: Juancarlos.lopez@cafedecolombia.com

(Lepidoptera: Pyralidae) (Dutky 1959). Este hospedante ha mostrado características buenas para la infección, parasitismo y penetración de EN (Poinar Jr y Himsworth 1967, Stock 1998), ratificándose hasta hoy como hospedante por su producción alta de EN. La producción *in vivo* de EN para propósitos comerciales en larvas de *G. mellonella* permite obtener promedios de producción de 30.000 a 50.000 juveniles infectivos (JI) por larva (Poinar 1979), llegando a promedios de producción de 200.000 JI por larva (Dutky *et al.* 1964). Sin embargo, este sistema de producción ofrece volúmenes mínimos en comparación con la producción masiva *in vitro* con el uso de medios artificiales (Wouts 1981); no obstante, se debe continuar mejorando su producción *in vivo* estandarizándola e implementando el almacenamiento y conservación de EN (Flanders *et al.* 1996). Con base en lo anterior y con el fin de conocer algunos parámetros de producción de EN en laboratorio para la realización de estudios básicos, se evaluaron en *Bombyx mori* y *G. mellonella* dos sistemas de infección que permitieran obtener principalmente JI para bioensayos en laboratorio.

Materiales y Métodos

Material biológico. Las especies de EN utilizados, *Steinernema carpocapsae* Brasil, *S. carpocapsae* All strain y *S. cubanum*, fueron suministrados por el Dr. Bernard Briscoe del CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International, CABI Biosciences, Lane, Egham, Surrey, Inglaterra).

Se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* de último instar con un promedio de peso de $0,20 \pm 0,018$ g, obtenidas de la cría del laboratorio de la Disciplina de Entomología de Cenicafé y larvas de cuarto instar de *B. mori*, con un peso de $2,51 \pm 0,12$ g, suministradas por la empresa Cokosilk de Pereira, Colombia.

Producción de JI para el bioensayo.

Los JI se multiplicaron y activaron de acuerdo con la metodología descrita por Poinar (1979), donde se infectaron larvas de último instar de *G. mellonella* (Fab.) (polilla mayor de las colmenas) con JI, mediante el sistema de infección topical por cada EN, se incubaron a 25°C y se colocaron en cámara seca; finalmente, se emplearon las trampas White (White 1927) en las mismas condiciones. Los JI emergidos se almacenaron a una temperatura de 12°C durante un tiempo no mayor a 5 días.

Desinfección superficial y ajuste de concentraciones de JI.

Los JI se dejaron a temperatura ambiente entre 20 y 24°C, durante 24 horas (tiempo y temperatura de acondicionamiento). Posteriormente, a 1.000 JI/ml, se adicionó 1,5 ml de solución desinfectante (Timerosal, Sigma®) al 0.1% en agua destilada estéril (ADE) durante 10 minutos; lo anterior permite la desinfección superficial del JI. Finalmente, se retiró el volumen máximo del desinfectante y se reemplazó por solución salina en ADE (NaCl 0,5%) ajustando a las con-

centraciones deseadas determinadas mediante conteos directos de JI, para el caso del sistema de infección topical e inyección.

Infección de hospedantes. La infección se realizó mediante dos sistemas; topical, aplicando una concentración por EN utilizado de 200 JI/ml por caja de Petri de 9 cm de diámetro x 1.5 cm, sobre papel filtro Whatman # 1 humedecido con 1 ml de ADE y luego colocando 10 larvas de cada hospedante por caja de Petri. El segundo fue por inyección, utilizando una jeringa de 1 ml, inyectando JI con una concentración de 25 ± 5 JI/20ml por larva en los últimos segmentos de la región posterior ventral de la larva. Todas las larvas una vez infectadas, se llevaron a 23°C en oscuridad constante durante 48 horas, de acuerdo con la metodología de Taylor y Shields (1990).

Desarrollo de síntomas, emergencia y conteos diarios de entomonemátodos.

Las larvas de los hospedantes se colocaron en cajas de Petri sobre papel filtro (cámara seca), manteniendo una temperatura de 23°C de 96 hasta 120 horas, tiempo en el cual se observó la sintomatología típica de infección por EN del género *Steinernema*: coloración amarilla a marrón. Las larvas que no presentaron dicha sintomatología se descartaron.

Al final de las 120 horas, mediante el uso de trampas de White, las cuales facilitan la emergencia y recuperación de EN, se colocaron individualmente las larvas de *G. mellonella* y *B. mori* que presentaron sintomatología, llevándolas a una temperatura de 23°C. Una vez se registró la emergencia de JI, se colectaron diariamente, realizando conteos hasta observarse un agotamiento en su producción. Mediante lavados sucesivos con agua destilada de los hospedantes de cada trampa "White", se vertió el agua de lavado en una probeta

graduada para establecer el volumen total empleado en la recuperación de JI y otros estados de EN que se colectaron en el agua de lavado (J4 "preadultos", hembras y machos). Posteriormente, el volumen total se agitó uniformemente y se tomó un volumen de 100 μ l, llevándose a una cámara de recuentos en acrílico de 4 x 3 cm con 49 cuadrantes, para contabilizar el número de JI, lo anterior se hizo seis veces por repetición. Conociéndose el volumen total y el número total de estados en 100 μ l, determinándose el número de estados por ml, se procedió a hacer el cálculo del número de estados de EN por larva/día.

Diseño experimental y variables evaluadas.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio, dispuesto en arreglo factorial 2x3x2, cuyos factores fueron los dos hospedantes, tres especies de EN y dos sistemas de infección, para un total de 12 tratamientos (Tabla 1). Diferencias significativas entre tratamientos, para las variables producción diaria y producción acumulada por larva se evaluaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de promedios de Tukey al 5% de significancia. Dichas variables por tratamiento fueron halladas mediante promedios. Como variable adicional se tuvo en cuenta el porcentaje de producción por hospedante.

Resultados y Discusión

En general, las variables evaluadas, producción diaria y producción acumulada de JI, mostraron diferencias entre hospedantes, sistemas de infección y especies de EN. Las producciones mayores de los dos EN de mayor multiplicación, *S. carpocapsae* Brasil y *S. carpocapsae* All strain, no coincidieron por hospedante, ni por sistema de infección; sin embargo, el hospedante *G. mellonella*, bajo el sistema topical para todas las especies evaluadas, se ubicó dentro de las producciones ma-

Tabla 1. Tratamientos constituidos para la producción *in vivo* de entomonemátodos

Tratamiento	Especie	Sistema de infección	Hospedante
T1	<i>S. carpocapsae</i> Brasil	Topical	<i>Bombyx mori</i>
T2	<i>S. carpocapsae</i> All strain	Topical	<i>Bombyx mori</i>
T3	<i>S. carpocapsae</i> Brasil	Topical	<i>Galleria mellonella</i>
T4	<i>S. carpocapsae</i> All strain	Topical	<i>Galleria mellonella</i>
T5	<i>S. carpocapsae</i> Brasil.	Inyección	<i>Bombyx mori</i>
T6	<i>S. carpocapsae</i> All strain	Inyección	<i>Bombyx mori</i>
T7	<i>S. carpocapsae</i> Brasil	Inyección	<i>Galleria mellonella</i>
T8	<i>S. carpocapsae</i> All strain	Inyección	<i>Galleria mellonella</i>
T9	<i>S. cubanum</i>	Inyección	<i>Galleria mellonella</i>
T10	<i>S. cubanum</i>	Topical	<i>Galleria mellonella</i>
T11	<i>S. cubanum</i>	Topical	<i>Bombyx mori</i>
T12	<i>S. cubanum</i>	Inyección	<i>Bombyx mori</i>

yores. En este orden de ideas, la producción varió en los hospedantes de acuerdo con la especie de EN utilizada, donde *S. carpocapsae* Brasil obtuvo su máxima producción en *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All strain obtuvo su máxima producción en *B. mori* (Tabla 2).

Producción de juveniles infectivos. Para la variable producción acumulada de JI por larva, se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Al realizar la prueba de comparación de promedios, se encontró que el tratamiento con mayor producción *S. carpocapsae* Brasil / topical / *G. mellonella*, fue estadísticamente igual a los tratamientos con las mayores producciones (Tabla 2a). No obstante, los tratamientos *S. carpocapsae* Brasil / Topical / *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All strain / inyección/ *B. mori* por el volumen de producción obtenido de JI por larva, con 149.258 y 139.756 respectivamente, registran producciones cercanas a las encontradas por Dutky *et al.* (1964), con 160.000 JI y 190.000 JI para *Steinernema carpocapsae* Mexican strain en *G. mellonella*. Es importante resaltar que la máxima producción total por larva, la obtuvieron estos mismos tratamientos *S. carpocapsae* Brasil / topical / *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All strain / inyección / *B. mori*, con 270.000 y 395.880 JI por larva, respectivamente, producciones que están incluso por encima de las registradas por Jansson (1996) quien obtuvo en larvas de *G. mellonella* un máximo de 238.692 JI por larva con dos especies del género *Heterorhabditis* (Bacardis y FL2122) con 137.229 y 238.692, respectivamente. Esta producción se refleja en la producción diaria máxima por larva con 67.800 y 108.200 JI/día respectivamente, siendo los tratamientos de mejor comportamiento para su implementación. Las producciones acumuladas para cada tratamiento (Fig. 1) se ajustaron a diferentes modelos lineales, siendo el modelo cuadrático, con los mayores coeficientes de correlación para todos los tratamientos, el que mejor explicó el comportamiento de producción, sin necesidad de incurrir en transformación de datos (Tabla 3), presentando los tratamientos *S. carpocapsae* Brasil / topical / *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All strain / inyección / *B. mori*, las mayores tasas de producción de JI (55.528 y 31.247 respectivamente, ratificando sus posibilidades de ser utilizadas en producción masiva *in vivo*.

S. cubanum obtuvo una de las producciones acumuladas más bajas de las especies de EN evaluados (Fig. 1), con 36.583 JI/larva en *G. mellonella* con el sistema topical, estando incluso, por debajo del promedio de producción por larva estimada para Steinernematodos, el cual fluctúa entre 70.000 y 90.000 JI (Poinar 1979).

En cuanto a producción diaria, se presentaron diferencias significativas entre trata-

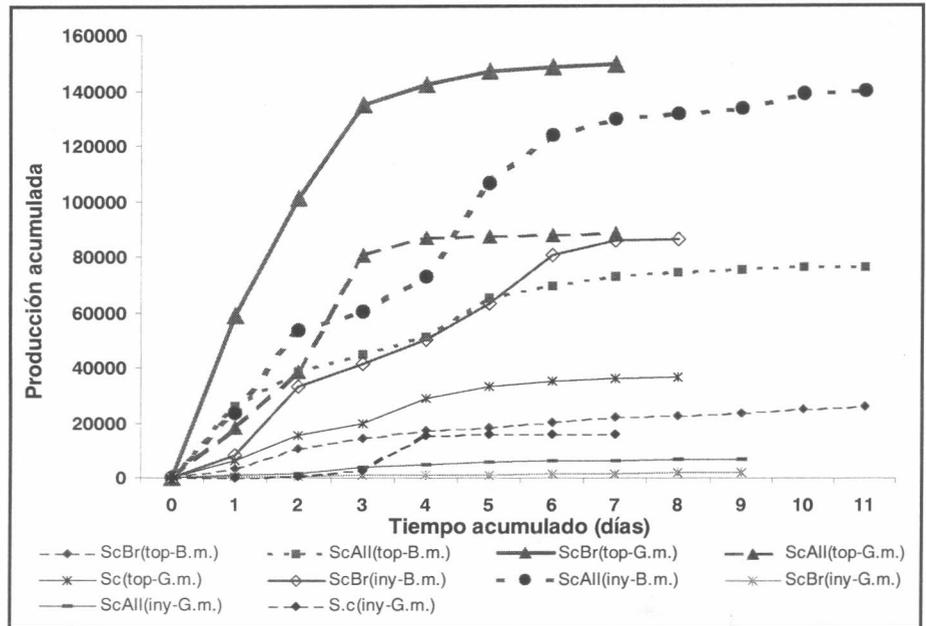


Figura 1. Producción acumulada en el tiempo de JI/larva por hospedante y sistema.

Tabla 2a. Promedio de producción acumulada de JI

Tratamiento	Prod. acum. ± E.E
T3	149.258 ± 26.898 A
T6	139.757 ± 35.417 AB
T4	87.708 ± 43.677 ABC
T2	76.067 ± 784 ABC
T5	68.737 ± 16.020 ABC
T10	35.619 ± 9.159 BC
T1	23.348 ± 7.530 C
T9	9.354 ± 8.174 C
T8	1.656 ± 506 C
T7	753 ± 230 C

Tabla 2b. Promedio de producción diaria de JI

Tratamiento	Prod. Día. ± E.E
T3	21.323 ± 2.155 A
T6	12.705 ± 2.243 B
T4	12.529 ± 1.407 B
T5	8.592 ± 892 BC
T2	6.915 ± 702 CD
T10	4.452 ± 497 CDE
T1	2.122 ± 298 CDE
T9	1.336 ± 528 DE
T8	184 ± 101 E
T7	81 ± 40 E

Promedios seguidos por distintas letras difieren significativamente, Tukey (0,05).

Tabla 3. Ecuaciones de promedios de producción acumulada

Tratamientos	Ecuación	r ²
T1	246 + 6.524X - 333X ²	0,99
T2	15.484 + 15.462X - 833X ²	0,96
T3	19.050 + 55.528X - 5.030X ²	0,93
T4	-21.854 + 49.031X - 4.464X ²	0,97
T5	-6.447 + 21.085X - 1.071X ²	0,97
T6	-5.403 + 31.247X - 1.547X ²	0,97
T7	2.295 + 609X - 30X ²	0,97
T8	-1.214 + 2.348X - 156X ²	0,97
T9	-8.893 + 6.892X - 459X ²	0,86

mientos ($p < 0,05$) (Tabla 2b), al igual que la anterior variable, presentándose en general entre el primer y tercer día, las mayores concentraciones de emergencia de JI (56% al 96%), para el 80% de los tratamientos evaluados; disminuyendo hasta su agotamiento entre el octavo y duodécimo día, tendencia general observada para la mayoría de los tratamientos (Fig. 2). La razón de este detrimento en la producción depende del tamaño del hospedante, el cual influye en el agotamiento rápido de la reserva alimenticia para la multiplicación del nemátodo, disminuyendo su producción a través del tiempo hasta el total agotamiento del hospedante (Fig. 2). Para este caso, claramente se observa que la producción de JI es dependiente del tamaño del hospedante ya que *G. mellonella* con un agotamiento entre 8 y 10 días (Fig. 3b) produjo un máximo de 270.000 JI/larva y *B. mori* con agotamiento entre 9 y 12 días, lo hizo con 395.880 JI/larva, corroborando lo encontrado por Dutky *et al.* (1964), quienes establecen que las diferencias de producción de nemátodos entomopatógenos están determinadas por el tamaño del hospedante.

Para la máxima producción diaria obtenida no hay un patrón definido entre especies hospedantes y sistemas de infección; cada especie de EN por sistema de infección, en el mismo hospedante y entre hospedantes, presenta características particulares en producción.

Al realizar la prueba de comparación de promedios, se encontró que *S. carpocapsae* Brasil/*G. mellonella*, con el sistema de infección topical, fue estadísticamente diferente a los demás, presentando la mayor producción diaria de todos los tratamientos (Tabla 2b), con un pico importante en el primer día (58.650 JI/larva), concentrando el 90% de su producción (134.950

JI), en los primeros tres días de emergencia (Fig. 2). A diferencia de lo anterior, al evaluar la misma especie de EN y hospedante por el sistema de infección inyección, se obtuvieron las producciones más bajas durante el experimento (Tabla 2b). En contraste con lo anterior, *B. mori*, con el sistema de infección por inyección, presentó producciones importantes, donde *S. carpocapsae* All strain produjo la mayor producción en este hospedante, concentrando el 72% (106.586 JI / larva) de su producción al quinto día, siendo la segunda producción de los tratamientos evaluados. Así mismo, *S. carpocapsae* Brasil / inyección en *B. mori* presentó un promedio de producción diaria de 8.592 JI por larva (Tabla 2 b), colectando en los tres primeros días el 64% de su producción (44.360 JI / larva) (Fig. 2). No obstante lo anterior, en este mismo hospedante el sistema de infección topical fue eficiente, donde *S. carpocapsae* All strain en *B. mori* concentró el 60% de su producción en los tres primeros días (44.800 JI / larva), con una producción promedio diaria de 6.915 JI por larva.

Obtención de otros estados de entomoneemátodos. La obtención de otros estados de EN (J4, hembras y machos) se debió al sistema de recuperación empleado (lavado diario de cada cámara de White), pues el agua de arrastre desprende algunos estados diferentes a JI, que solamente se desarrollan dentro del hospedante. No obstante, la medición de esta variable permitió obtener parámetros de comparación entre las especies evaluadas.

La obtención de J4 constituyó el segundo estado contabilizado de EN después los JI. En general, el mayor número acumulado obtenido lo presentaron los tratamientos *S. carpocapsae* Brasil y *S. carpocapsae* All strain / topical / *G.*

mellonella (14.075 y 12.081 J4/larva respectivamente), coincidiendo con los tratamientos de mayor producción de JI. Esta cantidad de J4 indica un buen desarrollo de la segunda generación de las especies de EN evaluadas de EN, particularmente *S. carpocapsae* Brasil y *S. carpocapsae* All strain en ambos hospedantes. Posiblemente este volumen alto de J4 desarrollados se deba a que por un reducido número de JI que penetraron en las larvas de los hospedantes en el proceso de infección, se presentó una densidad poblacional baja de EN en el interior de los hospedantes y se desarrollaron adecuadamente estados (J1, J2) y los JI sin salir del hospedante, pasan a J4 continuando el ciclo con una segunda generación en el hospedante (Sáenz 1998).

En los lavados se presentó una cantidad alta de hembras y machos de segunda generación. Tratamientos como *S. carpocapsae* All strain/ topical/ *G. mellonella* y *S. carpocapsae* Brasil /inyección / *B. mori* presentaron un número alto de hembras con 4.311 y 3.696 con el sistema de infección inyección en *B. mori* aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). Así mismo el tratamiento *S. carpocapsae* Brasil /inyección / *B. mori* presentó un número importante de machos con 1.372 por larva. Todo esto deja entrever que puede haber una segunda generación de las especies *S. carpocapsae* Brasil y *S. carpocapsae* All strain en los dos hospedantes evaluados *B. mori* y *G. mellonella*. Para este último, Sáenz (1998) registra que puede permitir hasta tres generaciones, caso particular para la especie *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón. Caso contrario lo presentó la especie *S. cubanum* que no produjo J4, hembras y machos, produciendo JI en los primeros cinco días y agotando a su hospedante en el noveno día, sin dejar entrever una segunda generación (Fig. 3b).

Especificidad del hospedante. *S. cubanum* no se multiplicó en *B. mori* bajo ningún sistema de infección (T11 y T12), aunque algunas larvas de *B. mori* presentaron sintomatología de afección por bacteriosis y posiblemente éste sea un caso de especificidad de especie de EN por hospedante tal como lo registraron Doucet *et al.* (1999), quienes encontraron que algunas especies de EN sólo se multiplican en cierto rango de hospedantes insectiles. Maxwell *et al.* (1994) afirman que la bacteria simbiote, *Xenorhabdus* spp., al no producir cantidades suficientes de antibióticos como xenocoumacina, bacteriocina o xenorhabdinas en el proceso de infección, no inhibe suficientemente las defensas del hospedante, lo cual afecta directamente la septicemia de la bacteria y la multiplicación del EN en el mismo hospedante.

Porcentaje de producción de hospedantes. En general, *B. mori* presentó los porcentajes más altos de producción de

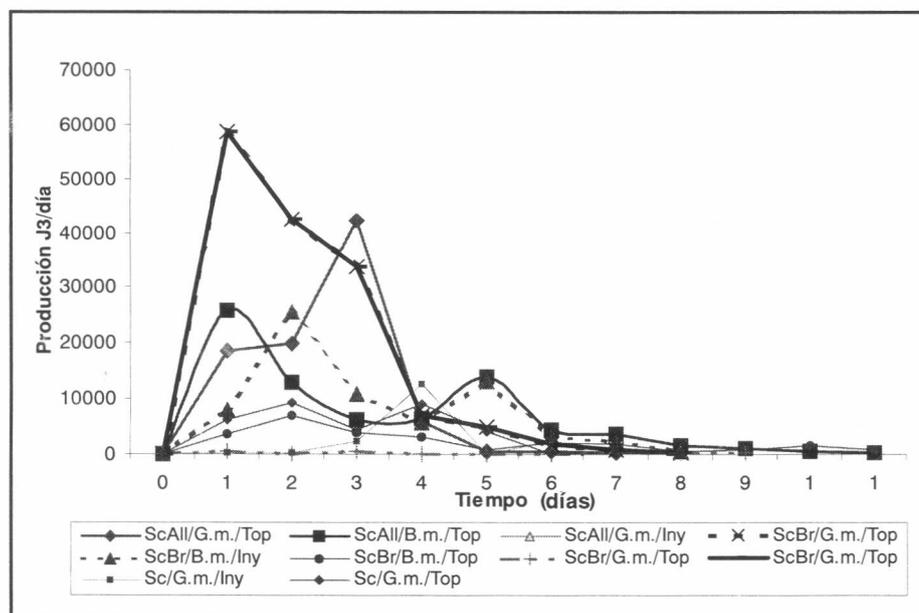


Figura 2. Producción diaria de JI por larva para los hospedantes y sistemas.

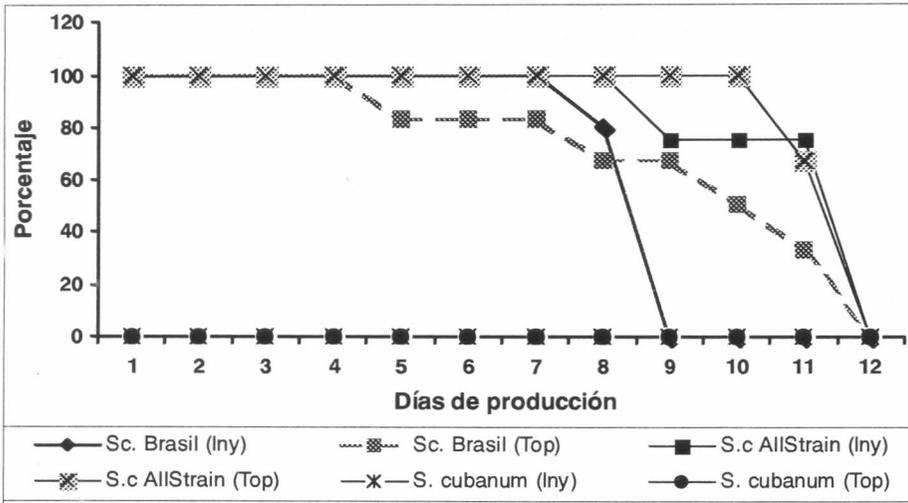


Figura 3a. Agotamiento de *B. mori* por los sistemas inyección y topical.

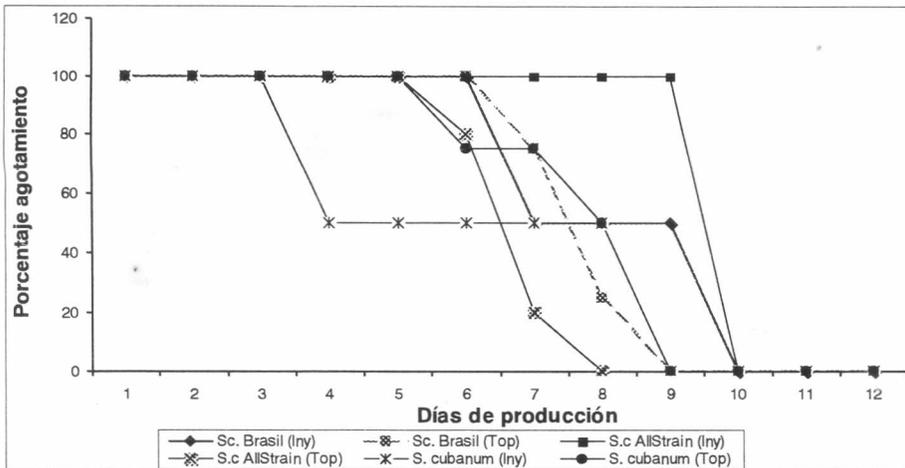


Figura 3b. Agotamiento de *G. mellonella* por el sistema inyección.

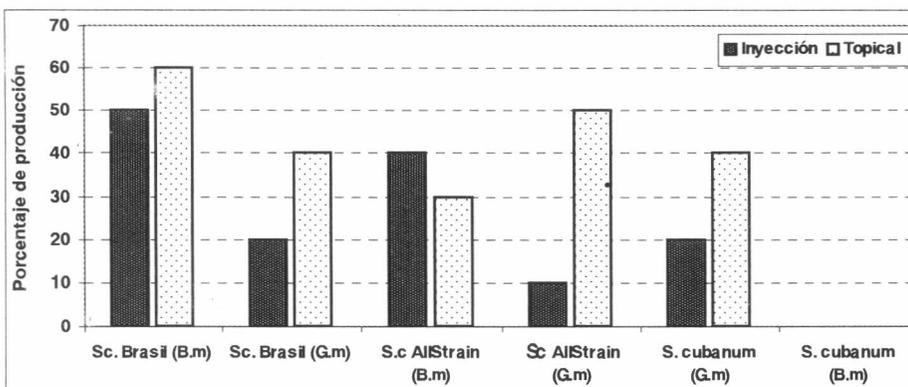


Figura 4. Porcentaje de producción de estados de larvas de *G. mellonella* y *B. mori*
 Nota: En las gráficas se utilizaron algunas convenciones para especificar los tratamientos. A continuación se relacionan las convenciones empleadas:

Sc. Brasil	: <i>S. carpocapsae</i> Brasil	G.m	: <i>Galleria mellonella</i>
Sc. All strain	: <i>S. carpocapsae</i> All strain	B.m	: <i>Bombyx mori</i>
Sc	: <i>Steinernema cubanum</i>	Top	: Topical
S.cubanum	: <i>Steinernema cubanum</i>	Iny	: Inyección

EN, para los dos sistemas de infección evaluados y para las dos EN de mayor producción, oscilando entre un 30 y 60% de producción de sus larvas, a excepción de *S. cubanum* que no se multiplicó bajo los sistemas de infección en este hospedante. *G. mellonella* se encuentra en un rango de producción más bajo, entre 10 y 50%; sin embargo, presenta diferencias en porcentaje de producción entre sistemas, siendo mucho más efectivo el sistema de infección topical para los tres EN evaluados (Fig. 4).

Conclusiones

- El hospedante *G. mellonella* se ratifica como el principal en producción *in vivo* de JI para las especies de EN evaluadas especialmente empleando el sistema de infección topical; así mismo, se registra a *B. mori* como hospedante alternativo en la producción *in vivo* para determinados EN y sistemas de infección, como es el caso de la producción de la especie *S. carpocapsae* All strain empleando el sistema de infección por inyección.

- Los tratamientos *S. carpocapsae* Brasil / topical en *G. mellonella* y *S. carpocapsae* All Strain / inyección en *B. mori* se mantuvieron dentro de la máxima producción acumulada de JI/larva, estimada para Steinernematidos, con 149.258 y 139.757 JI/larva. En cuanto a la máxima producción obtenida por larva, el tratamiento *S. carpocapsae* All Strain / inyección en *B. mori* superó los registros encontrados (395.880 JI/larva).

- Para producción *in vivo* de EN se debe tener en cuenta la especificidad del hospedante para la multiplicación de las especies de EN; caso concreto en el experimento, la especie *S. cubanum* no se multiplicó bajo ningún sistema de infección en larvas de *B. mori*, pero si logró multiplicarse utilizando los dos sistemas de infección en larvas de *G. mellonella*.

- La producción de JI, en general, para todos los tratamientos se concentró entre el segundo y quinto día, período en que se debe realizar la colección de EN ya que se presentan los picos de producción más altos, disminuyendo la producción entre el octavo y duodécimo día.

- Los sistemas de infección topical e inyección garantizan la multiplicación *in vivo*; sin embargo, la infección topical en general muestra una mayor eficiencia en cuanto a producción, posiblemente por presentarse libremente todos los procesos de infección en su hospedante, accediendo a éste por los orificios naturales (boca, ano o espiráculos), lo que pudo facilitar el desarrollo libre del nemátodo en su interior, por lo que se recomienda su uso. Sistemas de infección inducidos, como el de inyección en este caso, aunque pueden tener éxito en multiplicación, se recomienda principalmente para realizar estudios genéticos de especies de entomonemátodos o de especificidad al hospedante, ya que permite conocer con mayor exactitud el número de unidades infectivas o JI por insecto.

• Finalmente, ante la masiva y fácil obtención de estados diferentes a J1 durante la multiplicación *in vivo*, se considera su utilización en la producción masiva implementando técnicas de producción *in vitro*, especialmente en reactores.

Agradecimientos

Al personal de la Disciplina de Entomología, en especial al Sr. Uriel Posada Posada por la ayuda en el laboratorio, y al Sr. Gonzalo Hoyos y al Dr. Alex Bustillo por la revisión final del documento, al Centro Nacional de Investigaciones de Café "Cenicafé" que con su colaboración permitieron la realización de la investigación y a los revisores por sus valiosos aportes.

Literatura citada

- DE DOUCET, M. M. A.; BERTOLOTTI, A. L.; GIAYETTO A. L.; MIRANDA, M. B. 1999. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 237-242.
- DUTKY, S. R. 1959. Insect microbiology. *Advances in applied microbiology*. Academic press. (Estados Unidos) 1: 175-200.
- DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G.E. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* (Estados Unidos) 6: 417-422.
- 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.
- FLANDERS, L.K.; MILLER, M.J.; SHIELDS, J.E. 1996. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) 89(2): 373-380.
- GEORGIS, R. 1997. Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture. En: BCPC symposium proceedings. No. 68: 243-251.
- JANSSON, K. R. 1996. Infectivity and reproduction of three Heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in two insect host. *Florida entomologist*. (Estados Unidos) 79(3): 363-368.
- LACEY, L. A.; GOETTEL, M. S. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* (Holanda) 40 (1): 3- 27.
- MAXWELL, F.W.; CHEN, G.; WEBSTER, J.M.; DUNPHY, G.B. 1994. Stability and activities of antibiotics produced during infection of the insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) 60(2): 715 -721.
- POINAR, G.O. 1979. *Nematodes for Biological Control of Insects*. CRC Press, Boca Raton, 143-148.
- POINAR Jr., G.O.; HIMSWORTH T. P. 1967. Neoplectana parasitism of larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) 9(2):241-246.
- SÁENZ, A.A. 1998. *Steinernema feltiae* FILIPJEV, 1934 CEPA Villapinzon (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) Ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. (Tesis Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en entomología). 118 p.
- STOCK, P. 1998. Sistemática y biología de nemátodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional del Litoral Esperanza, Santa Fe, Argentina. Octubre 12-16. 88 p.
- TAYLOR, P. S.; SHIELDS, E.J. 1990. A microcomputer-controlled system of environmental chambers suitable for the study of thermoperiodic effects. *Environmental Entomology* (Estados Unidos) 19: 866-873.
- WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* (Estados Unidos) 66: 302-303.
- WOUTS, W. M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology* (Estados Unidos) 13(4): 467-46.