

**EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS
PARA EL CONTROL DEL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR, *Aeneolamia
varia* (F) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

MIRIAM ROSERO GUERRERO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
PALMIRA
2011**

**EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS
PARA EL CONTROL DEL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR, *Aeneolamia
varia* (F) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

MIRIAM ROSERO GUERRERO

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en CIENCIAS AGRARIAS
ÉNFASIS PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

DIRIGIDO POR:

ALEX ENRIQUE BUSTILLO PARDEY

Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

EYDER DANIEL GÓMEZ LÓPEZ

Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

Asesor

JUAN CARLOS LÓPEZ NÚÑEZ

Microbiólogo

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
PALMIRA**

2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PROTECCIÓN DE CULTIVOS

En Palmira a los 25 días del mes de Noviembre de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores FRANCIA VARON DE AGUDELO y NORA CRISTINA MESA COBO

Para calificar la Tesis de Grado de:

MIRIAM ROSERO GUERRERO

Titulada:

“EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS PARA EL CONTROL DEL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZUCAR, *Aeneolamia varia* (F) (HEMIPTERA:CERCOPIDAE)” bajo la dirección de Alex Enrique Bustillo y Eyder Daniel Gómez.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes FRANCIA VARON DE AGUDELO y NORA CRISTINA MESA COBO, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

FRANCIA VARÓN DE AGUDELO

NORA CRISINA MESA COBO

**“La facultad y los jurados de la tesis de grado
no se harán responsables de las
Ideas emitidas por el autor”
Artículo 24, resolución 04 de 1974**

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios por ser mi guía y fortaleza. A mis padres y hermano por su apoyo permanente, por la confianza que han depositado en mí, el inmenso amor que me han dado y por motivar mis días a continuar y cumplir metas tan importantes como estas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alex Enrique Bustillo Pardey por su apoyo, dirección y comprensión.

Al Dr. Juan Carlos López Núñez que con sus asesorías técnicas y consejos se logró gran parte del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eyder Daniel Gómez por su dirección y apoyo y a la Universidad Nacional de Colombia por la formación que me ha brindado.

Al Ingeniero Ulises Castro por su apoyo en cada una de las etapas de este trabajo.

Al grupo de Entomología de Cenicaña porque este trabajo es fruto del esfuerzo mutuo de un grupo capaz, direccionado y coordinando por excelentes personas.

A Cenicaña y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por contribuir con apoyo científico, logístico y económico en mi formación personal, profesional y en el desarrollo del trabajo.

A Cenicafé por donar cinco de las especies de nematodos entomopatógenos utilizadas en los diferentes ensayos.

Al Centro Agropecuario SENA – Buga por prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.

A ICA Santander, la alcaldía del municipio de Anapoima, Fedepanela y los propietarios de las fincas visitadas por colaborar en la consecución de los suelos estudiados.

Al Dr Alberto Palma por su asesoría en los análisis estadísticos.

A mis amigos de la UNAL y de Cenicaña que de corazón me acompañaron en este proceso.

A Walter Bermúdez Vargas por su apoyo, colaboración y amor.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de la presente investigación.

A todos y cada uno Mil Gracias.

CONTENIDO

	pág.
0. INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 EL SECTOR AZUCARERO EN LA ACTUALIDAD	17
2.2 PLAGAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	18
2.2.1 Los salivazos de la familia Cercopidae	19
2.2.2 Ciclo de vida de <i>Aeneolamia varia</i>	20
2.2.3 Importancia económica del salivazo	20
2.2.4 Estrategias de control del salivazo	22
2.2.5 Uso de nematodos entomopatógenos en el control del salivazo	23
2.3 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	24
2.3.1 Ciclo de vida	25
2.3.2 Efecto sobre organismos no blanco.....	26
2.3.3 Factores que influyen en el establecimiento y acción de nematodos entomopatógenos	27
2.3.6 Comercialización de nematodos como agentes de control.....	27
3. METODOLOGÍA	30
3.1 LOCALIZACIÓN.....	30
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.2.1 Nematodos entomopatógenos	30
3.2.2 Insectos.....	31
3.2.3 Caña de azúcar.....	32
3.3 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos.....	32
3.4 Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a ninfas de V instar y adultos de <i>A. varia</i> bajo condiciones de laboratorio	33
3.5 Evaluación de la virulencia de los nematodos entomopatógenos sobre los instares de <i>A. varia</i> , bajo condiciones de invernadero.....	34
3.6 Capacidad de búsqueda de los nematodos entomopatógenos	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos	38
4.2 Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a <i>A. varia</i> bajo condiciones de laboratorio	38
4.2.1 Efecto de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de V instar de <i>A. varia</i>	38
4.2.2 Efecto de nematodos entomopatógenos sobre adultos de <i>A. varia</i>	41
4.3 Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos sobre los instares de <i>A. varia</i> , bajo condiciones de invernadero	45
4.3.1 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de I instar.....	45
4.3.2 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de II instar.....	48

4.3.3	Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de III instar.	48
4.3.4	Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de IV instar.	49
4.3.5	Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de V instar.	52
4.4	Capacidad de búsqueda de nematodos entomopatógenos hacia <i>A. varia</i>	55
5.	DISCUSIÓN	58
5.1	Aislamiento de nematodos entomopatógenos	58
5.2	Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a <i>A. varia</i> bajo condiciones de laboratorio	58
5.3	Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos sobre los instares de <i>A. varia</i> , bajo condiciones de invernadero	60
5.4	Capacidad de búsqueda de nematodos entomopatógenos hacia <i>A. varia</i>	64
6.	CONCLUSIONES	66
7.	RECOMENDACIONES	67
	BIBLIOGRAFÍA.....	68

LISTA DE FIGURAS

pág.

- Figura 1.** Estados de desarrollo de *A. varia*. **A).** Adulto sobre follaje de pasto braquiaria; **B).** Detalle donde se muestra ninfas produciendo espuma al alimentarse de las raíces de caña de azúcar; **C)** Ninfa descubierta.32
- Figura 2.** Bioensayo de capacidad de búsqueda. **A).** Disposición de las unidades experimentales; **B).** Detalle del tubo de PVC donde se realizó el bioensayo.37
- Figura 3.** Porcentaje de mortalidad acumulada de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con seis especies de nematodos entomopatógenos.39
- Figura 4.** Sintomatología de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con nematodos entomopatógenos. **A).** Flacidez; **B).** Malformación; **C).** Ninfa muerta en la metamorfosis a adulto; **D).** Cambio de coloración causado por *Heterorhabditis bacteriophora*.40
- Figura 5.** Porcentaje de mortalidad acumulada de adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos.....42
- Figura 6.** Adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos. **A).** Detalles del bioensayo; **B).** Disección de adultos de *A. varia*; **C).** Nematodos entomopatógenos encontrados en el interior de adultos de *A. varia*.42
- Figura 7.** Detalle y disposición de los cilindros de acetato para la evaluación del efecto de nematodos entomopatógenos sobre adultos de *A. varia*.44
- Figura 8.** Porcentaje de mortalidad de adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$).....44
- Figura 9.** Porcentaje de mortalidad de ninfas de *A. varia* infectadas con dos dosis de *Heterorhabditis bacteriophora*.....45
- Figura 10.** **A).** Ninfa de *A. varia* de I instar infectada con *H. bacteriophora*; **B).** Nematodos observados al estereoscopio que se encontraban en el interior del cuerpo de una ninfa infectada por *H. bacteriophora*.46
- Figura 11.** **A).** Detalles del bioensayo utilizado; **B).** Adulto de *A. varia* que una vez emergido se desplaza a las hojas de la caña de azúcar.....47
- Figura 12.** Supervivencia y patogenicidad de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo en invernadero, 36 días después de aplicados los nematodos. **A).** Detalles del ensayo; **B).** Larva de *G. mellonella* afectada por nematodos entomopatógenos.47

Figura 13. Porcentaje de mortalidad de ninfas de III instar de <i>A. varia</i> infectadas con dos dosis de nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$).....	49
Figura 14. Porcentaje de mortalidad de ninfas de IV instar de <i>A. varia</i> infectadas con dos dosis de nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$).....	50
Figura 15. Ninfa de IV instar de <i>A. varia</i> muerta por efecto de nematodos entomopatógenos.	51
Figura 16. Porcentaje de mortalidad de ninfas de V instar de <i>A. varia</i> infectadas con dos dosis de nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$).....	52
Figura 17. Ninfas y Adultos de <i>A. varia</i> infectados con nematodos entomopatógenos. A). Ninfa de V instar de <i>A. varia</i> muerta por efecto de <i>H. bacteriophora</i> ; B). Adultos de <i>A. varia</i> muertos por efecto de nematodos entomopatógenos.	53
Figura 18. Porcentaje de mortalidad de ninfas de <i>A. varia</i> causada por los nematodos entomopatógenos que fueron atraídos al insecto. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)	56

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Presentaciones y precios de comercialización de nematodos entomopatógenos	29
Cuadro 2. Promedio de juveniles infectivos de los nematodos, emergidos de adultos de <i>A. varia</i>	41
Cuadro 3. Promedio de juveniles infectivos de los nematodos, emergidos de adultos de <i>A. varia</i>	43
Cuadro 4. Mortalidad de <i>G. mellonella</i> provocada por los nematodos entomopatógenos que se encontraban en el suelo 36 días después de la aplicación.....	48
Cuadro 5. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de IV instar de <i>A. varia</i>	51
Cuadro 6. Promedio de juveniles infectivos emergidos de ninfas de IV instar de <i>A. varia</i>	51
Cuadro 7. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de V instar de <i>A. varia</i>	53
Cuadro 8. Mortalidad (%) de ninfas de V instar de <i>A. varia</i> infectadas con diferentes especies de nematodos entomopatógenos en dos dosis: d1: 100 JI/cm ² y d2: 1500 JI/cm ²	54
Cuadro 9. Parasitismo de nematodos en adultos de <i>A. varia</i> infectados en el V instar ninfal	55
Cuadro 10. Porcentaje de nematodos entomopatógenos que se desplazaron con respecto a <i>A. varia</i> . Letras iguales no difieren (P<0.05)	56
Cuadro 11. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de IV instar de <i>A. varia</i>	57

RESUMEN

La detección de la especie *Aeneolamia varia* en la zona andina colombiana ocurrida en junio de 2007 sobre cultivos de caña de azúcar, es una amenaza para la producción de la industria azucarera y el sector panelero. Entre las herramientas de control biológico para este insecto está el uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa amigable con el ambiente. Debido a esto se evaluaron las especies de nematodos: *Steinernema colombiense*, *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp1, *Steinernema* sp2, *Heterorhabditis bacteriophora* y un aislamiento de *Steinernema* (O1R1) en dos dosis de 100 y 1500 juveniles infectivos JI/cm², sobre los diferentes estados ninfales de *A. varia* en plántulas de caña de azúcar bajo condiciones de invernadero. El estado adulto se evaluó bajo condiciones de laboratorio empleando una dosis de 100 JI/cm² y los sistemas de bioensayo de cajas Petri y cilindros de acetato. Se registró diariamente la mortalidad hasta completar el ciclo de vida del insecto. La mortalidad para cada estado ninfal varió entre las especies de nematodos y respondió diferencialmente con el incremento de la dosis. Se encontró que *Heterorhabditis bacteriophora* fue más eficaz en el control de los estados ninfales. El estado ninfal III fue el menos susceptible y el IV estado ninfal fue el más susceptible a *H. bacteriophora*, *Steinernema* sp2 y *Steinernema* sp1, presentando mortalidades de 89.1, 73.9 y 67.4 %, respectivamente con la menor dosis. En el estado adulto se presentó una mortalidad de 100% con todas las especies de nematodos evaluadas en el sistema de bioensayo de cajas de Petri mientras que en cilindros de acetato la mortalidad varió entre 40 y 54%. Adicionalmente se evaluó la capacidad de búsqueda de las seis especies nativas de nematodos entomopatógenos para encontrar ninfas de *A. varia* bajo condiciones de laboratorio. Para ello se utilizó un cuerpo de desplazamiento horizontal de 21 cm de largo, que contenían suelo estéril a capacidad de campo. En un extremo se ubicó una plántula de caña de azúcar de tres meses, infestada con ninfas de *A. varia* de IV instar, luego 1000 juveniles infectivos se depositaron en la mitad del cuerpo de desplazamiento. Cinco días después de aplicados los nematodos se estimó el número de nematodos en cada sección determinando el desplazamiento hacia o en sentido contrario donde se encontraban las ninfas de *A. varia*. Todas las especies fueron atraídas hacia las ninfas del salivazo, destacándose *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1, al registrarse desplazamientos de 56.3% y 77.4% y causarles mortalidades del 46% y 30%, respectivamente. Las especies *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1 se presentan como las más promisorias para su evaluación sobre ninfas en ensayos de campo.

Palabras clave: Caña de azúcar. *Aeneolamia varia*. Control biológico. *Steinernema*. *Heterorhabditis*.

ABSTRACT

The presence of the species *Aeneolamia varia* in sugarcane crops in Colombia's Andean region, initially detected in June 2007, is an ongoing threat to the country's sugar industry, particularly the *panela* (brown sugar loaf) sector. Because the use of entomopathogenic nematodes is an environment friendly biological control method of this pest, the efficacy of applying different nematode species—*Steinernema colombiense*, *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp1, *Steinernema* sp2, *Heterorhabditis bacteriophora* and an isolate of *Steinernema* (O1R1)—on different nymphal stages of *A. varia* was evaluated on sugarcane plantlets under greenhouse conditions. Nematodes were applied at two rates: 100 and 1500 infective juveniles (IJ)/cm². To evaluate the adult stage, bioassays were performed in Petri dishes and acetate cylinders under laboratory conditions, using a rate of 100 IJ/cm². Mortality was recorded daily until the insect's life cycle was completed. The mortality of each nymphal stage varied depending on nematode species, presenting a differential response with increasing application rate. The nematode *H. bacteriophora* was found to be more effective in controlling nymphal stages. Nymphal stage III was the least susceptible and stage IV the most susceptible, with mortality rates of 89.1% for *H. bacteriophora*, 73.9% for *Steinernema* sp2 and 67.4% for *Steinernema* sp1 at the lowest application rate. In the adult stage, 100% mortality occurred in all nematodes species evaluated in the bioassay using Petri dishes, whereas mortality ranged between 40 and 54% when acetate cylinders were used. In addition, the search capacity of the six native entomopathogenic nematode species to find *A. varia* nymphs was evaluated under laboratory conditions using a 21-cm-long unit containing sterile soil at field capacity that allowed horizontal movement of insects. A 3-month-old sugarcane plantlet, infested with *A. varia* instar IV nymphs, was located on one end of the unit and 1000 infective juveniles were then deposited in the middle of the unit. The number of nematodes in each section was determined five days after the nematodes were applied by determining the movement towards or away from where *A. varia* nymphs were found. All species were attracted to spittlebug nymphs, particularly *H. bacteriophora* and *Steinernema* sp1. The former recorded movements of 56.3%, with 46% mortality, and the latter movements of 77.4%, with 30% mortality. The species *H. bacteriophora* and *Steinernema* sp1 are considered to be the most promising for use in field trials to evaluate their control of *A. varia* nymphs.

Key words: Sugarcane. *Aeneolamia varia*. Biological control. *Steinernema*. *Heterorhabditis*.

0. INTRODUCCIÓN

Los Insectos denominados salivazos y más específicamente *Aeneolamia varia* (F.), junto con otras especies pertenecientes al mismo género, han sido consideradas como una de las plagas más importantes de la caña de azúcar y de los pastos en el continente americano (Peck, 1998).

Su detección en la zona andina Colombiana, ocurrida en junio de 2007 sobre cultivos de caña de azúcar, se constituye en una amenaza tanto para el sector panelero como para el sector azucarero (aproximadamente 450.000 ha) en términos de la producción, al igual que para el medio ambiente, por la necesidad de usar insecticidas por ausencia, al menos temporal de medidas de control de bajo impacto ambiental y social.

En el valle del río Cauca y en la zona panelera andina, además de la caña de azúcar, existen potreros sembrados con especies de pastos susceptibles al salivazo, tales como *Brachiaria decumbens*, y gramíneas silvestres que sirven como hospederos alternos para la plaga (Gómez, 2007).

El adulto del salivazo deposita los huevos cerca o entre las raíces, enterrados a 1 ó 2 cm de profundidad; también los pueden ovipositar sobre la superficie del suelo, estolones, residuos vegetales, lamina foliar y base del tallo (Peck *et al.*, 2002).

Las ninfas del salivazo introducen su aparato bucal en los tejidos de la raíz hasta alcanzar el xilema, causando una disminución e interrupción del transporte de agua y sales minerales (Byers y Wells, 1966). Los adultos se alimentan de la savia de las hojas, al tiempo que inyectan una toxina, la cual impide el transporte y respiración en la planta (Enkerlin y Morales, 1979). En las hojas se producen manchas alargadas de color pardo rojizo y finalmente los tejidos se secan lo que ocasiona disminución en el área disponible para la fotosíntesis y en la productividad (Gómez, 2007).

El daño económico que causan los salivazos puede llegar a ser considerable, limitando el desarrollo de la caña de azúcar y ocasionando pérdidas en producción, tanto en tonelaje como en sacarosa. Así por ejemplo, las pérdidas agrícolas e industriales ocasionadas por *Mahanarva fimbriolata*, en Brasil suman el 60% (Mendoza, 2001); en Ecuador, *M. andigena* puede reducir entre el 15 y el 34% del contenido de sacarosa (Mendoza, 2001). En el caso específico de *Aeneolamia varia*, las pérdidas establecidas en el área de influencia del central Río Turbio (Venezuela) indicaron disminución en la producción cercana al 25%, debido al efecto de su ataque (Salazar y Proaño, 1989).

Entre las medidas de control que reducen los efectos perjudiciales que puede tener el uso indiscriminado de insecticidas sobre el medio ambiente y el hombre, está el uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa que no ha sido muy explorada en Colombia. Los nematodos tienen características que los hacen importantes en el control biológico de insectos, como son la capacidad de desplazarse, buscar, encontrar y atacar a su presa, capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a condiciones adversas, resistencia a productos químicos, especificidad por insectos, inocuidad al medio ambiente y mamíferos y compatibilidad con otros entomopatógenos (Kaya, 1990; Rovesti y Deseo, 1990; Lewis y Gaugler, 1994; Glazer, 1996; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Akhurst y Smith, 2002).

De acuerdo con lo anterior y considerando que las ninfas del salivazo se encuentran principalmente cerca o dentro del suelo, donde la mayoría de las medidas de control son poco efectivas, el objetivo del presente estudio fue evaluar la virulencia de especies de nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* sp y *Heterorhabditis* sp., para el control del salivazo de la caña de azúcar, *A. varia*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la virulencia de especies de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Aislar especies de nematodos entomopatógenos obtenidos a partir de muestras de suelo de campos de caña (azucarera y panelera) de Guática-Risaralda, Anapoima- Cundinamarca y Oiba-Santander.
- Determinar la susceptibilidad de ninfas de *A. varia* al ataque de las especies de nematodos entomopatógenos aislados de campos de caña (azucarera y panelera) y cinco especies suministradas por el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), bajo condiciones de laboratorio.
- Determinar la susceptibilidad de adultos de *A. varia* al ataque de las especies de nematodos entomopatógenos aislados de campos de caña (azucarera y panelera) y cinco especies suministradas por el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar la aplicación de dos dosis de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de *A. varia* de diferentes estados de desarrollo bajo condiciones de invernadero.
- Determinar la capacidad de búsqueda de seis especies nativas de nematodos entomopatógenos para encontrar el hospedero *A. varia*.
- Establecer un banco de nematodos entomopatógenos en el Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar (Cenicaña) y enriquecer el banco ya establecido en Cenicafé.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL SECTOR AZUCARERO EN LA ACTUALIDAD

El sector azucarero colombiano se encuentra ubicado en el valle geográfico del río Cauca, que abarca 47 municipios desde el norte del departamento del Cauca, la franja central del Valle del Cauca, hasta el sur del departamento de Risaralda. En esta región hay 208.254 ha sembradas en caña para azúcar, de las cuales, el 24% corresponde a tierras propias de los ingenios y el restante 76% a más de 1.700 cultivadores de caña. Dichos cultivadores abastecen a los 13 ingenios de la región (Cabaña, Carmelita, Castilla, Incauca, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Providencia, Riopaila, Risaralda, San Carlos y Central Tumaco). Desde 2005, cinco de los trece Ingenios tienen destilerías anexas para la producción de alcohol carburante (Incauca, Manuelita, Providencia, Mayagüez y Risaralda) (Asocaña, 2010).

En Colombia, en el año 2009 se produjeron 2,6 millones de toneladas de azúcar a partir de 23.6 millones de toneladas de caña y de alcohol carburante se produjeron 325 millones de litros, destinados a la mezcla con gasolina en una proporción E10 (10% etanol, 90% gasolina) (Asocaña, 2010).

El consumo nacional de azúcar en Colombia es de 1,65 millones de toneladas, destinado en un 65% al consumo directo en los hogares y un 35% a la fabricación de productos alimenticios y bebidas para consumo humano. En el año 2009 se exportaron 1 millón de toneladas de azúcar, de las cuales el 76% se dirigió a las Islas Caribe, Chile, Estados Unidos, Perú, México, Sri Lanka y Canadá. El resto de las exportaciones se destinó hacia múltiples destinos alrededor del mundo (Asocaña, 2010).

El sector azucarero colombiano, en 2009 registró un crecimiento de 15,1%, contribuyendo con 0,1 puntos porcentuales al crecimiento económico nacional, si se tiene en cuenta que su participación en el PIB total es de 0,54% (Asocaña, 2010).

Con relación a los aspectos sociales, el sector genera 188.533 empleos en la cadena productiva desde los ingenios hacia atrás de la misma. Si se tiene en cuenta el empleo que se genera también hacia adelante de la cadena, se obtiene un total de 265.402 empleos a través de toda la cadena de valor (Asocaña, 2010).

En los últimos seis años los ingenios azucareros destinaron más de 20 mil millones de pesos a programas de proyectos educativos en la región y ha invertido en más de 2.900 soluciones de vivienda que favorecen a más de 11.600 personas en el valle geográfico del río Cauca (Asocaña, 2010).

El cultivo de caña además es un captador de gases de efecto invernadero, lo que ayuda a mitigar el cambio climático. Una hectárea sembrada en caña de azúcar libera anualmente cuarenta toneladas de oxígeno y captura sesenta toneladas de dióxido de carbono (Asocaña, 2010). La agroindustria azucarera, entre 1996 y 2008, ha invertido más de 188 millones de dólares en el área ambiental (Asocaña, 2009).

2.2 PLAGAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar, por su característica de monocultivo, está expuesta permanentemente al ataque de diferentes plagas, que con mayor o menor incidencia, causan daños a la planta, afectando su producción y rendimiento. En Colombia se tienen registradas en el cultivo de la caña de azúcar cerca de 50 especies de insectos, pero no todas son de importancia económica (Posada, 1989).

La caña de azúcar es especialmente susceptible a muchos insectos barrenadores del orden Lepidoptera y, en menor grado, del orden Coleoptera. En el Valle del Cauca predominan los barrenadores del género *Diatraea*: *D. saccharalis* y *D. indigenella*; el perforador de las yemas, *Blastobasis graminea* el barrenador de verano, *Elasmopalpus lignosellus*; los picudos de la caña *Metamasius hemipterus* y *Rhynchophorus palmarum* y el barrenador gigante *Telchin licus* (Lastra y Gómez, 2000; Bustillo, 2010).

Los insectos comedores de follaje se presentan con mayor o menor intensidad en todas las regiones geográficas donde se cultiva caña de azúcar. En Colombia, se presenta *Caligo illioneus oberon*, principalmente durante el periodo de maduración de la caña (Lastra y Gómez, 2000).

En Colombia se han registrado ataques esporádicos de insectos chupadores, tales como escamas (*Duplachionaspis divergens*, *Pulvinaria elongata*), piojos harinosos, pulgones (*Sipha flava*). Sus brotes en general son de poca duración y se han relacionado con cambios en el ambiente local (Lastra y Gómez, 2000). Sin embargo, el saltahoja hawaiano, *Perkinsiella saccharicida* y el salivazo, *A. varia* revisten un manejo especial y de permanente vigilancia debido a que la primera es vector de la enfermedad de Fiji (no introducida al continente americano) y la

segunda por su importancia como plaga en países vecinos como Venezuela y Brasil (Gaviria, 2007).

2.2.1 Los salivazos de la familia Cercopidae

Los salivazos (familia Cercopidae) constituyen plagas importantes que se desarrollan en muchas especies de plantas. Se registran atacando caña de azúcar, maíz, arroz, avena, sorgo y numerosas especies de la familia poáceas silvestres y cultivadas como pastos para alimentar ganado, bajo ciertas condiciones (Fewkes 1969, Nilake 1985, Souza y Nilake 1985).

Los géneros principales son *Aeneolamia*, *Deois*, *Mahanarva*, *Prosapia* y *Zulia* (Peck, 2001). Fewkes (1969) registró cerca de 31 especies de salivazos en el ámbito mundial y para América 24 especies, que han sido plagas de importancia económica o, al menos, asociadas con la caña de azúcar.

En Colombia hay registros de varias especies de salivazo encontradas sobre la caña de azúcar. En 1999, *Prosapia simulans* fue encontrada en Santander de Quilichao (Cauca) sobre pasto *Brachiaria dictyoneura* (Peck *et al.*, 2001) y a principios del 2005, se detectó en la Hacienda Piedechinche (Ingenio Providencia) sobre la caña de azúcar de la variedad CC 84-75. También en 1999 se reportó *Mahanarva andigena* en campos de caña panelera cultivada cerca de Tumaco (Nariño), siendo esta especie una plaga de importancia económica en Ecuador (Rodríguez y Peck, 2007).

En 2002, se registró la presencia de *Mahanarva bipars* (Walker), en lotes de caña panelera ubicados en la vereda de Santa Ana del municipio de Guática (Risaralda) (Peck *et al.*, 2004) y en junio de 2007 se detectó a *A. varia*, en el Valle del Cauca sobre la variedad CC 84-75 (Gómez, 2007). Esta última especie ha sido registrada como plaga severa de pastos en los Llanos Orientales, piedemonte de la Orinoquia y de la Amazonia Colombiana (Peck, 2001), y de la caña de azúcar en Venezuela (Linares y Salazar, 2007). Los niveles más altos encontrados alcanzaron los valores de 1.06 salivas y 1.2 adultos/tallo, en la Hacienda La Floresta (Ingenio Carmelita) sobre la variedad CC 85-92 (Castro *et al.*, 2009).

Los daños observados y resultantes de las altas poblaciones presentes de *A. varia*, obligaron a la aplicación de insecticidas de las suertes con focos más desarrollados y la quema, cosecha y renovación de la más afectada (Castro *et al.*, 2009).

Ante la situación, el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, por Resolución No 1932 de julio de 2007 declaró en emergencia sanitaria la zona de distribución del insecto (Bugá, Tuluá, Riofrío y Yotoco) que comprende 18.000 ha afectadas y

dictó medidas para evitar su dispersión en el Valle del Cauca y el resto del país (Castro *et al.*, 2009).

2.2.2 Ciclo de vida de *Aeneolamia varia*

Los salivazos se caracterizan porque en su estado inmaduro se recubren de una sustancia con apariencia de saliva que sirve de defensa contra enemigos naturales y como protección de condiciones climáticas adversas. La producción de espuma la llevan a cabo una vez que inician su alimentación, que puede encontrarse principalmente en el suelo alrededor de la cepa de la caña, en la parte basal de los tallos o en la raíz. Por lo general, en cada saliva se halla solo una ninfa (Gómez, 2007).

Sendoya *et al.* (2011) en Buga, Valle del Cauca (Colombia) bajo condiciones de invernadero determinó el ciclo de vida de *A. varia* sobre caña de azúcar estimando un ciclo total en 62 días: los huevos eclosionan luego de 15 días pasando por 5 instares ninfales que presentaron crecimiento durante 40.5 días y la longevidad de los adultos fue de 5 días.

Las hembras ponen los huevos en el suelo, donde pueden permanecer en quiescencia hasta que las condiciones de humedad relativa y la acumulación de agua en el suelo favorecen la eclosión. Esta estrategia evolutiva les permite a este tipo de huevos pasar exitosamente la época de sequía enterrados en el suelo hasta la época siguiente de lluvias (Evans, 1972).

2.2.3 Importancia económica del salivazo

Los adultos del salivazo introducen su estilete a través de los estomas de las hojas y no directamente a través de la epidermis, después pasa a través de varios tejidos de la hoja para alcanzar las células del parénquima. Las ninfas se alimentan directamente sobre el proto y meta-xilema en las raíces. Durante el primer instar, las ninfas también se alimentan de las células corticales del parénquima de raíces jóvenes. Cuando esto ocurre, el estilete generalmente alcanza la endodermis o el periciclo. Las ninfas del quinto instar alcanzan el xilema de las raíces (Hagley y Blackman, 1966). Byers y Wells (1966) menciona que al alimentarse las ninfas de la savia de las raíces se restringe el paso de agua y de nutrientes para los puntos de crecimiento y el desarrollo aéreo de la planta.

El daño más importante lo hacen los adultos al inyectar sustancias tóxicas (enzimas y aminoácidos) que provocan una intoxicación sistemática o fitotoxemia en los tejidos afectados, llamada 'candelilla', 'quemazón' o 'blight' (Byers y Wells,

1966) presentando en caña de azúcar porciones de manchas alargadas de color pardo rojizo y los tejidos terminan por secarse lo que ocasiona disminución en el área disponible para la fotosíntesis y por ende en la productividad de caña de azúcar (Gómez, 2007).

Las alteraciones metabólicas toman lugar en la respuesta de la caña de azúcar a la infestación del salivazo, produciendo gran variedad de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Ravaneli *et al.*, 2006). Estas sustancias reducen la recuperación de azúcar (inversión de sacarosa en glucosa y fructosa), el metabolismo de la levadura durante la fermentación, disminuye la producción de etanol, aumento en el contenido de fibra y altera la composición de los productos finales (Mutton y Mutton, 2002).

Los estudios realizados sobre el impacto económico en el proceso industrial del azúcar de *P. simulans* y *A. postica* en Guatemala demostraron que el periodo más crítico de daño de adultos ocurre de los 6 a los 8 meses de edad vegetativa de las cañas, originando una pérdida de 8.21 toneladas de caña por hectárea (TCH) y 5.83 Kg de azúcar por tonelada de caña (Cengicaña, 2007). A nivel comercial en caña con daño severo mayor de 50% de área foliar quemada, las pérdidas fueron de 10 TCH y en azúcar 11.36 Kg/TC (Montepeque, 2005). En México, Flores (1996) estimó que una población superior a 10 insectos adultos de *Aeneolamia* spp., por cepa puede causar reducción de 3 a 6 ton/ha.

En Ecuador se han registrado pérdidas hasta de 34% en sacarosa con la especie *Mahanarva andigena* (Mendoza, 2001), mientras que en Brasil las pérdidas agrícolas e industriales han llegado a 60% con la especie *M. fimbriolata* (Mendoca, 2001).

En el caso específico de *A. varia*, las pérdidas en el área de influencia del central Río Turbio (Venezuela) registraron disminución en la producción cercana al 25%, debido al efecto de su ataque (Salazar y Proaño, 1989).

En Colombia se desconoce cuál es el efecto que puedan tener estos insectos en la producción de la caña. En el Valle del Cauca la incidencia de esta plaga ha sido baja, menos del 5 %, que han sobrepasado el nivel de 0.2 individuos por tallo. Cenicaña junto con los ingenios azucareros más amenazados, determinó que alrededor de 20.000 ha comprendidas entre Buga y Tuluá tienen presencia de *A. varia* (Gómez y Gutiérrez, 2009).

Por otra parte, el daño económico del salivazo en la ganadería colombiana es de por lo menos \$41 millones de dólares anuales en pérdidas de producción de leche y carne. Además, los costos de producción se incrementan entre 4% y 15% (Holmann, 2008).

2.2.4 Estrategias de control del salivazo

Debido a que la acción nociva del insecto no es nueva para la caña de azúcar y que ya existen estrategias de control, se han tomado en cuenta las experiencias adquiridas por otros países afectados por esta especie u otras relacionadas para iniciar un plan de manejo en Colombia.

En la zona de emergencia sanitaria los Ingenios deben determinar, para fines de manejo, cuales son los niveles de incidencia del insecto realizando evaluaciones en el 25% de su área sobre suertes con cultivos menores de 6 meses, por ser estas donde se pueden dirigir las medidas de control (Gómez, 2007). Fuera de la zona de emergencia sanitaria, consiste en la detección oportuna de *A. varia* dentro de sus campos empleando trampas pegajosas.

El umbral de control se presenta cuando se capturen 50 adultos/semana por trampa o avistamiento de 0.2 salivas/tallo o bien 0.2 adultos/tallo (Gómez, 2007)

- **Control químico**

En los cultivos de caña de azúcar afectados por esta plaga, los insecticidas se utilizan en situaciones de emergencia mediante la autorización de entidades gubernamentales como el ICA en Colombia (Gutiérrez y Gómez, 2009).

- **Control cultural**

El control cultural comprende diversas actividades como prácticas mecanizadas de cultivo que permitan exponer los huevos del salivazo al sol y a la acción adversa del ambiente y los enemigos naturales. Se recomienda utilizar cultivadora tipo Lilliston (Gómez, 2007). El uso de trampas pegajosas, instalando 25 trampas por hectárea, en la periferia de las suertes que además de monitoreo sirve de extracción de los adultos del cultivo (Gómez, 2007) y disminuir la humedad al proporcionarle a las plantas de caña de azúcar buen drenaje interno y superficial evita la aparición de raíces adventicias que sirven de alimentación a las ninfas, como también la formación de un microclima húmedo, el cual debe permanecer por debajo del 80% entre las plantas de caña y el suelo y de esta manera se afecta el desarrollo normal de ninfas y adultos de la plaga (Gaviria y Rodríguez, 2004).

Control genético

El uso de especies de plantas resistentes al ataque de insectos plaga es económica, ecológica y ambientalmente benéfico. En Brasil se registró la variedad SP83-5073 como resistente al salivazo *Mahanarva fimbriolata* (Guaimaraes *et al.*, 2007). Cenicaña en la actualidad está adelantando estudios para el mejoramiento

de variedades de caña de azúcar resistentes al salivazo *A. varia* (Cuaran *et al.*, 2011).

- **Control biológico**

En Brasil a partir de 1964, después de la aparición epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre cercópodos de la caña de azúcar adquirió importancia su estudio por parte de los investigadores. Se ha aplicado este entomopatógeno hasta en 100.000 ha/año de caña de azúcar para el control de *M. posticata* (Lecuona, 1996). En Costa Rica se aplica *M. anisopliae* en el cultivo de caña de azúcar para el control del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) con dosis de 2.5 a 5 x 10¹² conidios/ha (Carballo y Falguni, 2004). En Colombia se han realizado evaluaciones con cepas de *M. anisopliae* a nivel de invernadero en caña de azúcar sobre ninfas y adultos de *A. varia* con resultados promisorios (Obando *et al.*, 2011).

Se ha registrado enemigos naturales como la mosca *Salpingogaster nigra* (Diptera: Syrphidae), depredador de todas las especies de salivazo de raíz en caña de azúcar y pastos y la hormiga *Pheidole genalis* (Hymenoptera: Myrmicinae) la cual es empleada como depredador de *M. fimbriolata* en Brasil (Mendonça, 2005).

Según Allard (1987), el uso de los nematodos entomopatógenos en conjunto con *M. anisopliae* puede ofrecer una solución a largo plazo para el control de *A. varia*.

2.2.5 Uso de nematodos entomopatógenos en el control del salivazo

Ensayos en laboratorio y campo han mostrado que cerca de 17 órdenes y 135 familias de insectos son susceptibles a los nematodos entomopatógenos en algún grado (Akhurst y Smith, 2002).

Existen varios registros del efecto de los nematodos entomopatógenos afectando especies de salivazo. Poinar y Linares (1985) determinaron en los años 1981-1982, en las localidades de Guanare (Portuguesa, Venezuela), una alta incidencia natural del nematodo *Hexameris dactylocercus*, el cual parasitaba hasta un 50% de las ninfas y adultos recolectados de *A. varia*. Bennett (1984) destaca la posibilidad de usar nematodos para el control de *A. varia* basándose en información existente desde principios de siglo. Menciona también el nematodo mermitido *Hexameris* sp., parasitando a *A. varia* en Trinidad, y en Brasil, sobre *M. fimbriolata*.

Ferrer *et al.* (2004) en Venezuela, presentaron el primer registro sobre la posibilidad de uso de nematodos entomopatógenos para el control de *A. varia* en caña de azúcar encontrando que *Heterorhabditis bacteriophora* a las 72 horas después de la aplicación a ninfas ocasionaba una mortalidad entre 71,3 y 75,4%, en dosis de 50 a 100 millones de nematodos por hectárea.

Leite *et al.* (2002) fueron los primeros en evaluar la eficacia de *Steinernema sp.* y *Heterorhabditis sp.*, en el control de salivazo de caña de azúcar en Brasil, ellos registraron un 80% de mortalidad utilizando un aislamiento de *Heterorhabditis*, en laboratorio. Años más tarde, Leite *et al.* (2005) evaluaron la patogenicidad de seis especies de nematodos entomopatógenos contra ninfas de salivazo de la caña de azúcar *M. fimbriolata* en laboratorio y campo encontrando que *Heterorhabditis sp.*, (CB- N5), *Steinernema sp.*, (CB-N6) y *Heterorhabditis sp.*, (CCA) fueron los tres nematodos más virulentos (100%, 98% y 96% de mortalidad, respectivamente). En el experimento de campo con una dosis de $3,3 \times 10^8$ JI/ha, *Heterorhabditis sp.*, controló el 74% de los insectos.

Recientemente en Brasil, Batista y Machado (2010) registran a *Steinernema riobravis* y a *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 causando mortalidades de 71% a una concentración de 2000 JI/ml sobre ninfas del salivazo de los pastos *Mahanarva spectabilis* bajo condiciones de invernadero.

En Colombia Arango y Calderón (1981), mencionan haber encontrado en condiciones de campo un nematodo de la familia Rhabditidae afectando ninfas y adultos del salivazo. Quintero *et al.* (2007), realizaron investigaciones en laboratorio y observaron la capacidad patogénica y multiplicación de *S. colombiense* y *H. bacteriophora* cepa Fresno, sobre ninfas de diferentes instares de *Aeneolamia sp.*

2.3 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Después del Phylum Arthropoda, el Nematoda (= Nemata) es uno de los más diversos y versátiles del reino animal, con un número estimado de más de 100.000 especies (Coomans, 2000; De Ley, 2000). Han logrado colonizar los ambientes más diversos y variados como tundras, desiertos, ambientes marinos y de agua dulce, o aguas termales y aguas congeladas (Stock, 1998).

Los nematodos son gusanos cilíndricos no segmentados, que poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la epidermis seguida por las fibras musculares longitudinales. Tienen sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero sin sistema circulatorio y respiratorio (Kaya y Stock 1997).

Se consideran promisorias ocho familias para el control biológico de insectos, estas son: Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Aphelenchidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (De Ley y Blaxter, 2002).

Las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae están asociados simbióticamente a las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente (Boemare, 2002), las cuales matan al hospedero rápidamente, razón por la cual han despertado interés mundial para ser desarrolladas como biocontroladores de insectos plaga.

En Colombia, la información sobre la presencia de especies nativas de *Steinernema* es escasa. En 1998, la especie *Steinernema feltiae* Filipjev, cepa Villapinzón se reportó aislada de muestras de suelo de la Sabana de Bogotá (Sáenz, 1998). En otros estudios, diferentes especies de *Steinernema* se registraron aisladas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Parada, 2006) y en el Valle del Cauca se reportó a *S. kraussei* Steiner (CIAT 2003a; Melo *et al*, 2004; Melo *et al*, 2006).

Trabajos realizados en Cenicafé, han mostrado la diversidad de estas especies en la zona cafetera central y su potencial uso en programas de control biológico de insectos plaga en la agricultura colombiana (López *et al.*, 2008). En cuanto al género *Heterorhabditis*, se tienen dos registros de *H. bacteriophora* Poinar, 1976, uno en el Valle del Cauca asociado con la “chinche de la yuca”, *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) (Caicedo y Bellotti, 1996), y otro aislado de suelo cultivado con café en Fresno, Tolima. En el mismo estudio de biodiversidad de steinernematidos y heterorabditidos en zona cafetera, se reportó el hallazgo de dos nuevas especies de *Heterorhabditis* (López *et al.*, 2007).

2.3.1 Ciclo de vida

Las especies de estas dos familias presentan un ciclo de vida basado principalmente en seis estados de desarrollo: huevo, cuatro ínstares de estados juveniles (conocidos también como “dauer”) y adulto (hembra, macho o hermafrodita según el género) (Wouts, 1991).

El tercer estado juvenil o juvenil infectivo (JI) se introduce en el insecto por sus aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) (Tanada y Kaya, 1993) o a través de las partes suaves del integumento (Peters y Ehlers, 1994), no obstante, los JI de los heterorabditidos también pueden penetrar el insecto raspando la cutícula del mismo, debido a que poseen una estructura queratinosa que se asemeja a un pequeño diente (Poinar, 1976).

Cuando el juvenil infectivo entra al hemocele del insecto libera la bacteria. La bacteria se multiplica rápidamente y mata al insecto por septicemia entre 24 y 48 horas (Adams y Nguyen, 2002). Los nematodos se reproducen en el cadáver del insecto y se alimentan de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (Boemare, 2002).

La reproducción del nematodo continua hasta que la reserva de alimento que proporciona el hospedante es suficiente para continuar con un nuevo ciclo, usualmente se puede presentar hasta tres generaciones amfimícticas dentro del mismo insecto. Por el contrario, si la reserva alimenticia no es suficiente, el JI adquiere la bacteria simbiote alimentándose de los tejidos del cadáver del insecto y posteriormente, lo abandona en busca de un nuevo hospedero. Los juveniles infectivos no se alimentan y pueden sobrevivir en el suelo por varios meses (Adams y Nguyen, 2002).

2.3.2 Efecto sobre organismos no blanco

Ensayos en laboratorio y campo han mostrado que cerca de 17 órdenes y 135 familias de insectos son susceptibles a los nematodos entomopatógenos en algún grado (Akhurst y Smith, 2002). Este amplio rango de hospederos es una de las principales razones del gran interés actual en el desarrollo de nematodos para el control biológico, pero este atributo es un arma de doble filo. Sin embargo, la infectividad ha sido demostrada en experimentos en cajas Petri donde el insecto está en contacto permanente con el nematodo bajo condiciones óptimas y donde las barreras ecológicas y de comportamiento han sido removidas (Kaya y Koppenhöfer, 1999).

Los predadores y parasitoides son potencialmente afectados por los nematodos entomopatógenos a través de una infección directa, muerte temprana del hospedero parasitado, o reducción de la población del hospedero (Akhurst y Smith, 2002).

A pesar de la amplia aplicación, se ha reportado que no hay una toxicidad aguda o crónica significativa para los seres humanos o de otros vertebrados y no presenta importantes repercusiones a largo plazo en poblaciones de invertebrados no objetivo. Sin embargo, su uso potencial requiere de medidas preventivas que deben ser tomadas durante las fases de producción y aplicación para evitar la exposición directa de los nematodos y sus simbiotes (Akhurst y Smith, 2002).

2.3.3 Factores que influyen en el establecimiento y acción de nematodos entomopatógenos.

Los nematodos entomopatógenos varían frente a los factores abióticos en sobrevivencia y eficacia de parasitismo. Es así, como pueden actuar dentro de un amplio rango de temperatura (3 a 35°C) (Patel *et al.*, 1997). Caso contrario sucede con valores de pH del suelo extremos (11 ó 3) ya que limitan su capacidad de infección, pero no su viabilidad, y humedades extremas, afectan su viabilidad y establecimiento, debido al desecamiento del JI, dificulta su movilidad y capacidad de búsqueda del hospedante y generan condiciones anaerobias que reducen su viabilidad (Ishibashi y Kondo, 1990; Koppenhöfer *et al.*, 1997). Los suelos salinos o con altas concentraciones de iones como aluminio, afectan su integridad celular y por lo tanto, su viabilidad (Glazer, 1996). El uso de agroquímicos también puede afectar la permanencia y supervivencia de nematodos debido a que su ingrediente activo puede actuar como modificador de las características del suelo. Dependiendo de los tiempos de exposición a la mayoría de agroquímicos (fertilizantes, fungicidas, insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento y extractos vegetales), presentan sinergismo en algunos casos, al aplicarse en mezcla para el control de algunos insectos plaga (Kaya, 1990; Glazer, 1996), pero resultan susceptibles a algunos nematicidas (Glazer, 1996).

Las especies de nematodos difieren en la susceptibilidad a los pesticidas químicos, por ejemplo los heterorabditidos tienden a ser más sensibles a los cambios físicos, incluyendo pesticidas más que los steinernematidos (Grewal, 2002). También resultan los heterorabditidos más sensibles a condiciones de almacenamiento.

En cuanto a los factores bióticos, se ha reportado una diversidad de organismos como hongos, bacterias, virus, protozoos, ácaros, insectos y nematodos, que pueden llegar a ser antagonistas o factor de mortalidad de estos nematodos entomopatógenos en el campo (Kaya, 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Epsky, *et al.*, 1998). Esta interacción puede afectar la sobrevivencia del JI; afectar el establecimiento y/o desarrollo del simbiote, y afectar al insecto una vez ha sido invadido por el nematodo (Kaya, 1990). Mientras que otros organismos pueden ser benéficos al aumentar la eficacia por el incremento de la susceptibilidad a la infección por el nematodo, reduciendo el periodo letal de infección, o presentando un efecto adictivo o sinérgico sobre la mortalidad (Kaya, 1993; Koppenhöfer *et al.*, 1999).

2.3.6 Comercialización de nematodos como agentes de control.

Dentro de las técnicas exitosas de producción de nematodos que se han desarrollado e implementado, se encuentra el cultivo monoaxénico en líquido,

tecnología que garantiza una producción masiva constante, asegurando tanto la estabilidad del inóculo como de las fuentes de material y reduciendo costos de producción en cuanto a equipos se refiere (Friedman, 1990).

El desarrollo de formulaciones también ha ocupado la atención y el dinero de las compañías. La investigación en este sentido se ha enfocado en la facilidad de aplicación y aumento de persistencia del biológico incrementando su efectividad en el control (López, 2002). Se puede encontrar formulaciones desarrolladas en matrices de geles (alginato, arcilla, poliácridamida, entre otras), con diversas presentaciones (sólidas, semisólidas y líquidas) (Georgis y Hom, 1992; Hominick y Collins, 1997).

Por otro lado, una amplia gama de tecnología está disponible para la aplicación de nematodos entomopatógenos, incluidos los sistemas de riego y diversos equipos de pulverización. La elección de los equipos de aplicación, y la manera en que los nematodos se aplican, pueden tener un impacto sustancial sobre la eficacia del control de la plaga.

Los nematodos entomopatógenos son principalmente usados como agentes de control biológico inundativo y los JIs son liberados en números masivos, normalmente 2.5×10^9 JIs/ha, el cual tiene como objetivo obtener una supresión inmediata de la plaga (Georgis y Manweiler, 1994). La susceptibilidad del insecto, comportamiento ecológico, formulación, facilidad de uso, almacenamiento y costo del producto ha limitado el uso de nematodos para ciertos insectos y mercados (Georgis, 2002).

Las tres principales compañías que lideraban la comercialización de los nematodos entomopatógenos eran: Thermotriology Ltda® (antes, Biosys), Microbio Ltda® y Koppert Ltda®, distribuyendo sus productos por medio de patentes, en más de 11 países europeos (Hominick y Collins, 1997). Actualmente en el mundo, más de 80 compañías comercializan productos con solamente ocho especies de nematodos de las 35 registradas (López, 2002).

Más de la mitad de los productos existentes en el mercado (68%), se han desarrollado con base en dos especies: *Steinernema carpocapsae* (37%) y *Heterorhabditis bacteriophora* (31%); otros productos incluyen especies como *S. feltiae* (17%), *H. megidis* (5%), *S. glaseri*, *H. indica*, *H. marelati* (3% c/u) y *S. riobrave* (1%) (López, 2002). En el cuadro 1 se presentan algunos ejemplos de presentaciones y precios con los que se comercializan los productos.

En Colombia, los trabajos en investigación con nematodos son escasos y por ende no se han incorporado estos organismos dentro de programas MIP. Con excepción de la información obtenida en los últimos años por algunos Centros de Investigación como Cenicafé, Cenipalma, CIAT, ICA y Corpoica y algunas universidades apoyados por estos Centros, la producción a este nivel es mínima.

Lo anterior, se debe principalmente al desconocimiento tanto de los entomopatógenos en sí (biología, comportamiento, distribución, entre otros), como del amplio potencial que tienen para implementarse en programas MIP (López, 2005). Sin embargo, actualmente hay dos empresas que producen nematodos comercialmente y están iniciando trabajos para la producción masiva, como son Bioagro en Cartago (Valle) y Perkins en Palmira (Valle).

Cuadro 1. Presentaciones y precios de comercialización de nematodos entomopatógenos

Nematodo	JI (millones)	Dosis (m2)	Precio	
			US \$	\$
<i>Steinernema sp.</i>	10	84-232	24,9	49.800
<i>Steinernema sp.</i>	50	1.000	54	108.000
<i>Steinernema sp.</i>	100	2.000	99	198.000
<i>Steinernema sp.</i>	200	4.000	190	380.000
<i>H. bacteriophora</i>	10	204	25,9	51.800
<i>H. bacteriophora</i>	50	408	54	108.000
<i>H. bacteriophora</i>	100	2.000	104	208.000
<i>H. bacteriophora</i>	200	4.000	196	392.000

Tomado de López (2008)

3. METODOLOGÍA

3.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio (Temperatura media de 24 ± 0.7 °C y 70 ± 3 % de humedad relativa) e invernadero (Temperatura media de $26,6 \pm 0.85$ °C y $70,7 \pm 4.3$ % de humedad relativa) en las instalaciones del Centro Agropecuario SENA - Buga en el departamento del Valle del Cauca ubicado a $3^{\circ} 54' 07''$ de latitud norte y $76^{\circ} 18' 14''$ de longitud al oeste, a 969 m.s.n.m donde se encuentra establecida la cría de *A. varia*.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1 Nematodos entomopatógenos

El Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) facilitó cinco especies de nematodos entomopatógenos provenientes de suelos de la zona cafetera colombiana: *Steinernema colombiense*, *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp1, *Steinernema* sp2 y *Heterorhabditis bacteriophora*. Estos nematodos se multiplicaron en el laboratorio en larvas de *Galleria mellonella*, criadas en una dieta artificial (Realpe *et al.*, 2007).

Igualmente, se efectuaron muestreos de suelo en campos de caña donde se ha registrado la presencia de salivazo para aislar nematodos entomopatógenos. Para esto se realizaron visitas a lotes ubicados en los municipios de Guática (Risaralda), Anapoima (Cundinamarca) y Oiba (Santander). En cada uno de estos municipios, se realizaron dos recolecciones: en octubre de 2009 y mayo 2010, cada una de ellas correspondiente al periodo de sequía y lluvia, respectivamente

En cada región y para cada lote seleccionado, se tomaron un total de 20 muestras de suelo de aproximadamente 1 kg cada una. Las muestras se tomaron a una profundidad de 20 cm utilizando un barreno para facilitar su extracción. Cada muestra se identificó y se transportó al laboratorio para ser evaluada.

De cada muestra, se tomó dos sub- muestras de 300 g que se dispusieron en recipientes plásticos con tapa. Cada sub-muestra se llevó a capacidad de campo y se le adicionó cinco larvas de *G. mellonella* siguiendo la metodología de Bedding y Arkhurst (1975).

Las evaluaciones se realizaron 4 y 8 días después, y las larvas muertas se colocaron en trampas White modificada (Kaya y Stock, 1997) que consistieron en una base o tapa de caja Petri de 5 cm de diámetro, incluida en una base de caja Petri de 10 cm de diámetro. Sobre el aditamento de menor tamaño, se colocó un disco de papel filtro y sobre éste los cadáveres de los insectos. Posteriormente, se adicionó entre 15 a 20 ml de agua destilada en la base del recipiente de mayor tamaño.

Todo el proceso mencionado anteriormente se realizó dos veces, pues no siempre en el primer intento se recuperan los nematodos. Durante este tiempo, se observó la sintomatología presentada por las larvas.

Los insectos que durante este tiempo presentaron flacidez de su cuerpo, mal olor o total endurecimiento, se retiraron inmediatamente ya que comúnmente su muerte se debe a otros agentes como virus, bacterias y hongos, los que eventualmente pueden causar infecciones secundarias en larvas que verdaderamente han sido infectadas por los nematodos, inhibiendo su desarrollo (López, 2008).

La recolección de nematodos de la trampa White, se realizó diariamente hasta que se observó reducción en su producción procediendo a su almacenamiento (White, 1927).

A cada muestra con signos de parasitismo por nematodos, se le asignó un código de identificación de la zona y con los JI de los nematodos emergidos, se probaron los postulados de Koch en larvas de *G. mellonella*.

3.2.2 Insectos

Los adultos y ninfas de *A. varia* utilizados en los ensayos se obtuvieron de la colonia establecida por Cenicaña en las instalaciones del SENA en el municipio de Buga bajo condiciones de invernadero (Figura 1).

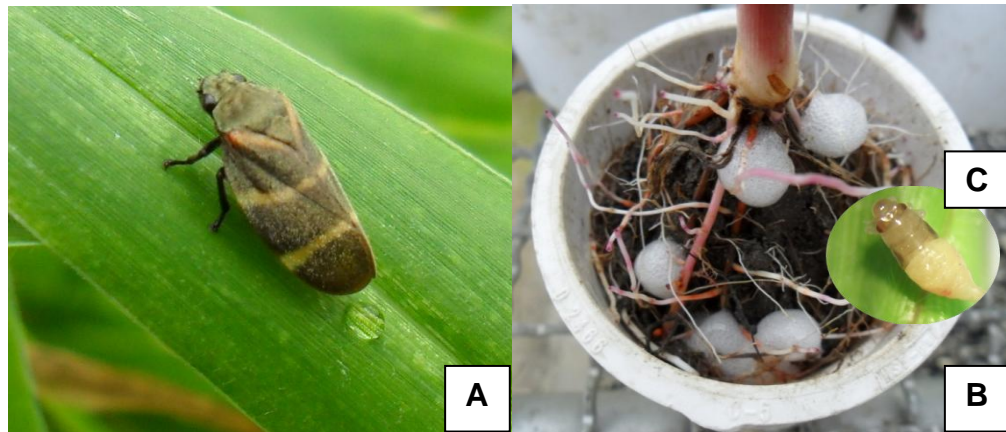


Figura 1. Estados de desarrollo de *A. varia*. **A).** Adulto sobre follaje de pasto braquiaria; **B).** Detalle donde se muestra ninfas produciendo espuma al alimentarse de las raíces de caña de azúcar; **C)** Ninfa descubierta.

3.2.3 Caña de azúcar

Se sembraron yemas de caña de azúcar de la variedad CC 8592 procedentes de tallos con edad aproximada de 8 meses. Las yemas se sometieron a un pre tratamiento con el fin de asegurar que estén libres de plagas y enfermedades según la metodología desarrollada por Victoria *et al.* (1997). Las plantas empleadas en los ensayos tenían una edad aproximada de tres meses.

3.3 Multiplicación de los nematodos entomopatógenos

La producción de nematodos se realizó *in vivo* en larvas de *G. mellonella* e incluyó las siguientes etapas:

- a. **Cría de *G. mellonella*:** Se desarrolló a partir de 1000 huevos del insecto (90 mg) en 1 kg de dieta artificial. Para obtener 1 kg de la dieta, inicialmente se mezcló 464 g de salvado de trigo, 69 g de levadura seca y 67 g de cera de abejas derretida. Posteriormente se adicionó 207 g de glicerina y 193 g de miel de abejas. Esta mezcla se colocó en recipientes cerrados (Realpe *et al.*, 2007).
- b. **Infección de larvas de *G. mellonella*:** Se realizó en recipientes cerrados con papel toalla en los cuales se dispusieron 100 larvas, posteriormente se infectaron mediante aspersion manual con 10.000 nematodos de la especie que se iba a producir. Luego los recipientes se llevaron a incubación por 48

h a 24°C, 80% de humedad relativa obteniendo mortalidades de 97 a 100% (López, 2008).

En la etapa de maduración, el nematodo se desarrolla y se produce en el interior de la larva parasitada: 100 larvas parasitadas se llevaron a mallas plásticas en bandejas multiusos (18*21*5 cm) y agua en su superficie. Cada bandeja se mantuvo bajo las mismas condiciones de la infección (López, 2008).

- c. Cosecha de nematodos:** Después de 10 a 12 días de haber hecho la infección se observó la aparición de nematodos sobre los cadáveres de las larvas, los cuales se retiraron mediante aspersión de agua estéril, cubriendo la superficie de la malla y arrastrando hasta el fondo del recipiente al nematodo emergente (López, 2008).
- d. Almacenamiento:** Diariamente se retiró el agua asperjada, la cual se concentró en un colector final y allí, se decantó los nematodos por gravedad, durante 4 h. Al final de este tiempo se retiró el agua y se procedió a su almacenamiento en espuma de poliéter poliuretano de densidad 12 con aproximadamente 2 millones/espuma de 8*10cm.

Con base en este proceso, se conoce que una larva de *G. mellonella* produce aproximadamente 75.000 nematodos (Juveniles Infeccivos) de *S. colombiense*, con una viabilidad mínima del 95%, lo que permite un almacenamiento en esponja (30 millones), hasta por 6 meses, sin que se disminuya su viabilidad en más de 10% (López, 2008).

3.4 Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a ninfas de V instar y adultos de *A. varia* bajo condiciones de laboratorio

Se realizaron bioensayos correspondientes a las cinco especies de nematodos suministrados por Cenicafé: *Steinernema colombiense*, *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp1, *Steinernema* sp2 y *Heterorhabditis bacteriophora* y los nematodos aislados de las muestras de suelo con el fin de determinar la patogenicidad sobre ninfas de V instar y adultos de *A. varia* bajo condiciones de laboratorio.

Se confinaron tres ninfas en una caja Petri de 14 cm de diámetro, con papel toalla en cuyo interior se encontraba un estolón de pasto braquiaria mantenido en solución nutritiva, que sirvió de alimento a las ninfas. Las ninfas de *A. varia* se colocaron en contacto con 15400 Juveniles infeccivos (JI) por caja Petri (100

Jl/cm²) aplicados por aspersión en 6 ml de agua estéril. Al tratamiento testigo se aplicó agua estéril. En el bioensayo con adultos se confinaron tres teneales (adultos de menos de 24 horas de edad) de *A. varia* en una caja Petri de 14 cm de diámetro siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Las cajas Petri con los insectos infectados se mantuvieron a temperatura ambiente y el pasto se cambió cada dos días.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorio. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones para un total de 30 ninfas y 30 adultos por tratamiento.

Las evaluaciones de la mortalidad de *A. varia* se realizaron diariamente y durante cinco días. Se estimó el promedio de ninfas y adultos muertos por tratamiento, y se corrigió teniendo en cuenta la mortalidad en el testigo (Schneider-Orelli, 1947):

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \left(\frac{\% \text{ mt} - \% \text{ mta}}{100 - \% \text{ mta}} \right) \times 100$$

mt = mortalidad en el tratamiento.

mta = mortalidad en testigo absoluto.

Adicionalmente, se realizaron observaciones sobre la producción de los nematodos en el 50% de los individuos muertos colocándolos en cámara "White" modificada (Kaya y Stock, 1997). El 50% restante de los individuos se disecaron, determinando el número de nematodos que lograron parasitar cada insecto. Lo anterior se realizó cuando el porcentaje de mortalidad fue superior a 20%, de lo contrario se disecaron en su totalidad los insectos muertos.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y las diferencias entre tratamientos se analizaron a través de la prueba de Duncan al 5% utilizando el programa estadístico SAS 9.1.3.

Después de determinar la patogenicidad de la (s) especie (s) de nematodos entomopatógenos sobre adultos y ninfas de V instar se procedió a realizar bioensayos en invernadero.

3.5 Evaluación de la virulencia de los nematodos entomopatógenos sobre los instares de *A. varia*, bajo condiciones de invernadero

En esta etapa se determinó la susceptibilidad de los diferentes instares (I, II, III, IV y V) de *A. varia* a los nematodos entomopatógenos que resultaron patogénicos al

insecto en las pruebas de laboratorio, evaluando dos dosis de JI/cm² de la unidad experimental (d1: 100 y d2: 1500 JI/cm²).

Las unidades de experimentales fueron plántulas de caña de azúcar variedad CC 85-92 sembradas en recipientes de PVC de 6 cm de diámetro y 7 cm de largo infestadas con cinco ninfas. La metodología de siembra se basó en la diseñada en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) para evaluar materiales de pasto braquiaria con resistencia varietal a ninfas de *A. varia* (Cardona *et al.*, 1999). Las plántulas de caña de azúcar presentaron un volumen adecuado de raicillas secundarias que son el sitio de alimentación preferido de las ninfas.

Ocho días después de la infestación con huevos de *A. varia* se aplicaron los nematodos entomopatógenos en 10 ml de una solución de agua estéril y un dispersante (Carrier® 0.1%), dirigida a las ninfas de I instar empleando una pipeta.

Para efectuar los bioensayos con ninfas de II, III, IV y V instar de *A. varia* se infestaron con huevos de *A. varia* y las aplicaciones de los nematodos se realizaron en el momento en que se desarrolló cada estado ninfal en 10 ml de una solución de agua estéril y un dispersante (Carrier® 0.1%), dirigida a las ninfas empleando un atomizador.

Las evaluaciones se llevaron a cabo diariamente hasta completar el ciclo del insecto. Se estimó la proporción promedio de ninfas muertas por tratamiento, corregida por el testigo según Schneider-Orelli (1947).

Adicionalmente, se realizaron observaciones de reproducción de los nematodos en el 50% de los individuos muertos colocándolos en cámara "White" modificada (Kaya y Stock, 1997). El 50% restante de los individuos se disecaron determinando el número de nematodos que lograron parasitar cada insecto. Lo anterior se realizó si el porcentaje de mortalidad es superior a 20%, de lo contrario se disecaron en su totalidad los insectos muertos.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente aleatorio. Al tratamiento testigo se aplicó agua estéril. Cada tratamiento consistió de 10 repeticiones y cada unidad experimental se conformó por cinco ninfas, para un total de 50 individuos por tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza y las diferencias entre tratamientos se analizaron a través de la prueba de Duncan al 5% utilizando el programa estadístico SAS 9.1.3.

3.6 Capacidad de búsqueda de los nematodos entomopatógenos

Se evaluó la capacidad de búsqueda de cinco especies de nematodos entomopatógenos *Steinernema websteri*, *Steinernema* sp2, *Steinernema* sp1, *Steinernema colombiense*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema* O1R1 para encontrar ninfas de IV instar de *A. varia* bajo condiciones de laboratorio.

Se utilizó un sistema de bioensayo para desplazamiento horizontal, que consistió de tubos de PVC de 7 cm de diámetro por 7 cm de largo. Tres de estas secciones se unieron para formar un cuerpo de desplazamiento de 21 cm de largo. Estos recipientes contenían suelo estéril (suelo + arena 3:1) a capacidad de campo y en un extremo se encontraba una plántula de caña de azúcar infestada con cinco ninfas de *A. varia* de IV instar (Figura 2).

1000 juveniles infectivos (JI) se dispensaron en un ml de agua estéril en la mitad del cuerpo de desplazamiento (10.5 cm). Al tratamiento testigo se le aplicó sólo agua estéril.

Cinco días después de aplicados los nematodos se extrajo de cada sección el suelo y se estimó el número de JI presentes en cada sección, mediante conteos de JI utilizando el método de tamizado y decantación de Cobb (1918) modificado para la recuperación de los nematodos. Para cada sección se realizaron 10 conteos. Adicionalmente se determinó el número de ninfas muertas por unidad experimental.

El bioensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorio, cada tratamiento consistió de 10 repeticiones y cada unidad experimental se conformó por cinco ninfas, para un total de 50 individuos por tratamiento.

La información se analizó mediante un análisis de varianza y las diferencias entre tratamientos se analizaron a través de la prueba de Duncan al 5% utilizando el programa estadístico SAS 9.1.3.



Figura 2. Bioensayo de capacidad de búsqueda. **A).** Disposición de las unidades experimentales; **B).** Detalle del tubo de PVC donde se realizó el bioensayo.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos

En las muestras de suelo se encontraron en algunas larvas de *G. mellonella*, nematodos que por sus características morfológicas resultaron ser saprófagos. La separación entre saprófagos y patógenos se realizó aplicando los postulados de Koch, registrando síntomas en larvas así como comportamiento típico.

Los nematodos entomopatógenos recuperados en este estudio corresponden a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. En el primer muestreo de suelo realizado en el municipio de Oiba (Santander) en la finca “El puerto” en la Vereda Santa María propiedad de José Gregorio Rincón, se aisló un nematodo entomopatógeno correspondiente a la familia Steinernematidae identificado como O1R1. El sitio tiene las siguientes coordenadas: longitud $-73^{\circ} 19' 23.574''$ W y latitud $6^{\circ} 12' 9.216''$ N.

En el segundo muestreo de suelo de Guática (Risaralda) en la finca “La Colombina” en la vereda Santa Ana, propiedad de Ramón Medina se aisló un nematodo de la familia Heterorhabditidae, codificado como Gua31. Las coordenadas de ubicación son longitud $75^{\circ} 49' 9.4439''$ W y latitud $5^{\circ} 18' 58.86''$ N.

Estos aislamientos se reprodujeron en larvas de *G. mellonella* y se mantienen almacenadas en espuma en las instalaciones de los Laboratorios de Entomología de Cenicafé y Cenicaña.

El suelo de donde se aislaron los nematodos presentó un pH de 4.9 (El Puerto) y 5.6 (La Colombina) con una textura franco arcillosa y arcillosa respectivamente.

4.2 Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a *A. varia* bajo condiciones de laboratorio

4.2.1 Efecto de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de V instar de *A. varia*.

De acuerdo con el análisis de varianza, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P= 0.3458$) en la mortalidad de las ninfas de *A. varia* con las diferentes especies de nematodos. Después de 7 días de estar expuestas las

ninfas a los nematodos se registró una mortalidad del 3% con *Heterorhabditis bacteriophora* y 17% con *Steinernema websteri* (Figura 3). El testigo, no presentó mortalidad durante el tiempo de la evaluación.

La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez, malformación, detención de la metamorfosis a adulto y cambio de coloración para el caso de *H. bacteriophora* (Figura 4).

Debido a que el porcentaje de mortalidad de las ninfas no superó el 20% se diseccionaron en su totalidad los insectos muertos. Durante las disecciones de las ninfas muertas se observó que lograron penetrar el cuerpo en promedio 7 JI de *S. websteri*, 28 JI de *Steinernema sp2*, 6 JI de *Steinernema sp1*, 2 JI de *S. colombiense*, 4 JI de O1R1 y 4 JI de *H. bacteriophora*.

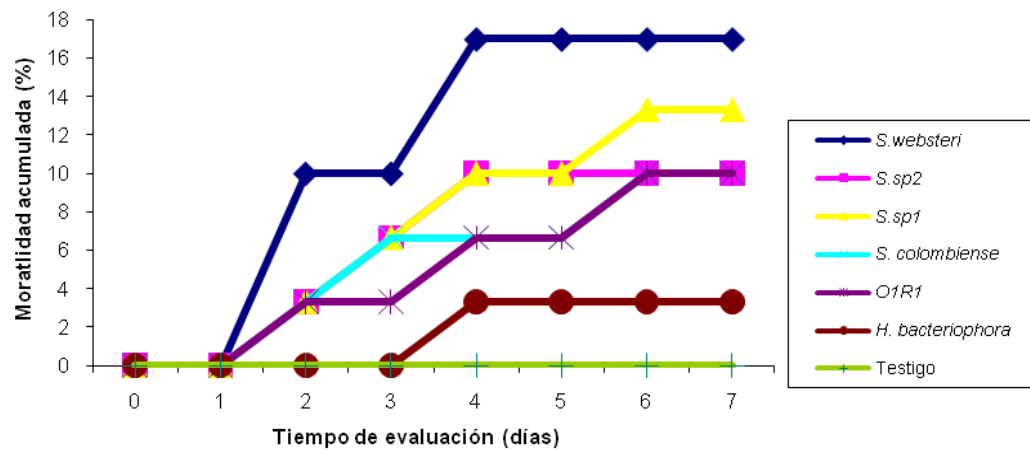


Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con seis especies de nematodos entomopatógenos.

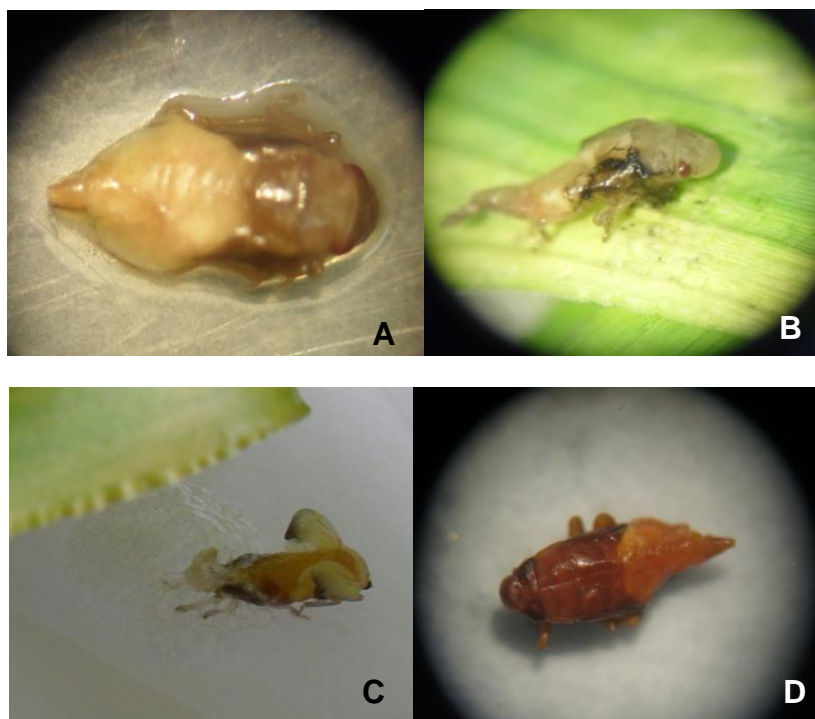


Figura 4. Sintomatología de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con nematodos entomopatógenos. **A).** Flacidez; **B).** Malformación; **C).** Ninfa muerta en la metamorfosis a adulto; **D).** Cambio de coloración causado por *Heterorhabditis bacteriophora*.

Las ninfas que sobrevivieron continuaron su desarrollo hasta el estado adulto. En este estado se observó una mortalidad del 100%, la cual ocurrió al cabo de 1 a 3 días después de su transformación a adulto. En el testigo no se presentó mortalidad de adultos.

Durante las disecciones de los adultos parasitados se observó que lograron penetrar en el cuerpo del insecto en promedio 18 JI de *S. websteri*, 20 JI de *Steinernema* sp2, 6 JI de *Steinernema* sp1, 10 JI de *S. colombiense*, 13 JI de O1R1 y 10 JI de *H. bacteriophora*.

En todos los tratamientos se presentó emergencia de nematodos de los adultos de *A. varia*, más no de todos los individuos del salivazo. La mayor producción de JI se presentó con *Steinernema* sp1 con un promedio de 4933 JI/ adulto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio de juveniles infectivos de los nematodos, emergidos de adultos de *A. varia*

Nematodo	Jl producidos
<i>Steinernema websteri</i>	3124
<i>Steinernema</i> sp2	2684
<i>Steinernema</i> sp1	4933
<i>Steinernema colombiense</i>	1399
<i>Steinernema</i> O1R1	654
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	1728

4.2.2 Efecto de nematodos entomopatógenos sobre adultos de *A. varia*.

Los resultados indicaron que el mayor porcentaje de mortalidad se presentó 48 h después de la infección para todos los tratamientos. Después de 72 h de estar expuestos a las diferentes especies de nematodos se registró una mortalidad acumulada de 100% de los adultos de *A. varia* (Figura 5). El testigo, no presentó mortalidad durante el tiempo que tomó la evaluación. No se observó sintomatología de parasitismo (flacidez o cambio de color).

Durante las disecciones de los adultos parasitados (Figura 6) se observó que después de 48 h de su muerte, hubo desarrollo de estados adultos de los nematodos entomopatógenos (NEP) y lograron penetrar en el cuerpo del insecto en promedio 11 JI de *S. websteri*, 22 JI de *Steinernema* sp2, 39 JI de *Steinernema* sp1, 32 JI de *H. bacteriophora*, 14 JI de O1R1 y 14 JI de *S. colombiense*.

En todos los tratamientos se presentó emergencia de nematodos de los adultos de *A. varia*, más no en todos los individuos. La mayor producción de JI se presentó con *H. bacteriophora* con un promedio de 30201 JI/adulto (Cuadro 3).

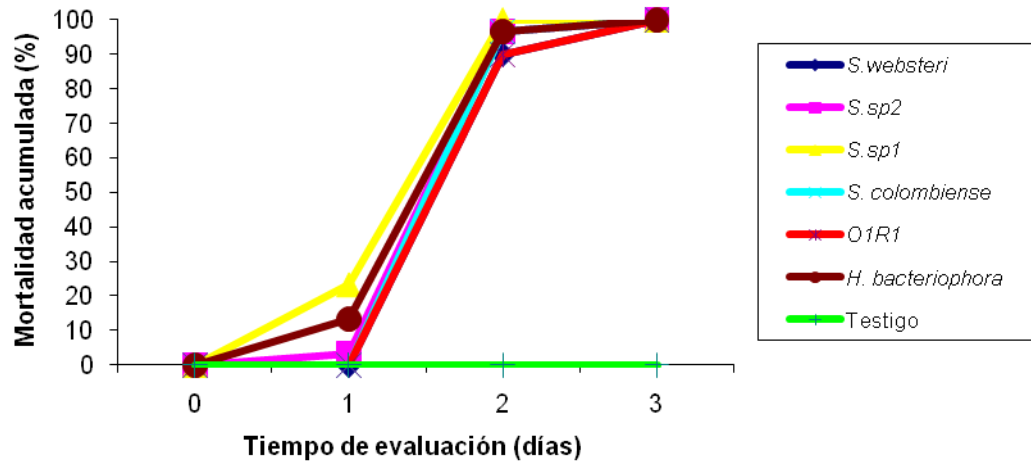


Figura 5. Porcentaje de mortalidad acumulada de adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos

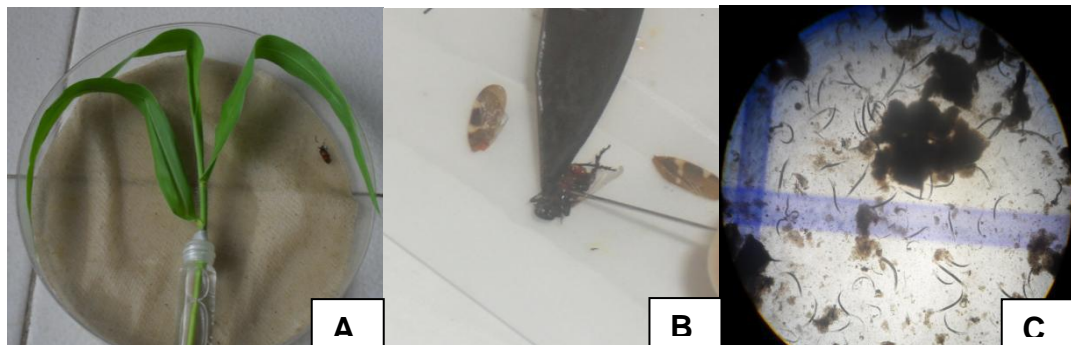


Figura 6. Adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos. **A).** Detalles del bioensayo; **B).** Disección de adultos de *A. varia*; **C).** Nematodos entomopatógenos encontrados en el interior de adultos de *A. varia*.

Cuadro 3. Promedio de juveniles infectivos de los nematodos, emergidos de adultos de *A. varia*

Nematodo	Jl producidos
<i>Steinernema websteri</i>	3735
<i>Steinernema</i> sp2	1512
<i>Steinernema</i> sp1	3676
<i>Steinernema colombiense</i>	5438
<i>Steinernema</i> O1R1	5024
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	30201

Las especies de nematodos evaluadas ocasionaron 100% de mortalidad en el estado adulto sin embargo, se debe tener en cuenta que los adultos permanecieron confinados obligándolos a estar en contacto con los nematodos y no bajo condiciones de su habito alimenticio representado en las hojas de la planta disminuyendo la probabilidad de contacto. El testigo, no presentó mortalidad durante el tiempo que tomó la evaluación.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un bioensayo en el cual plántulas de caña de azúcar y tres tenerales (adultos de menos de 24 horas de edad) se introdujeron en un cilindro de acetato transparente cubierto en la parte superior e inferior con tul y a las cuales se asperjó 100 JI/cm², tanto en suelo como en el follaje determinando el porcentaje de mortalidad de los adultos (Figura 7).

De acuerdo con los análisis de varianza, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de mortalidad para las especies de nematodos. Después de 96 h de estar expuestos los adultos de *A. varia* a los NEP se registró una mortalidad acumulada entre 40 y 54%. El testigo, presentó una mortalidad de 8%. No se observó sintomatología de parasitismo (flacidez o cambio de color) (Figura 8).

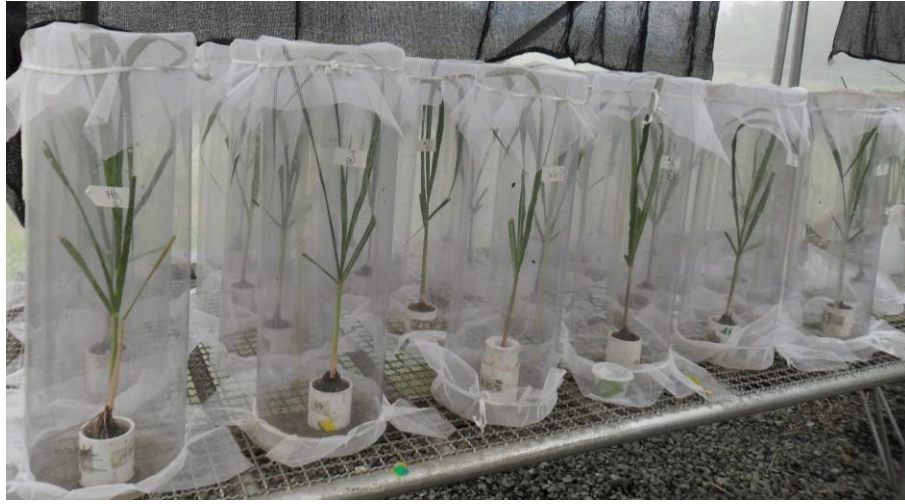


Figura 7. Detalle y disposición de los cilindros de acetato para la evaluación del efecto de nematodos entomopatógenos sobre adultos de *A. varia*.

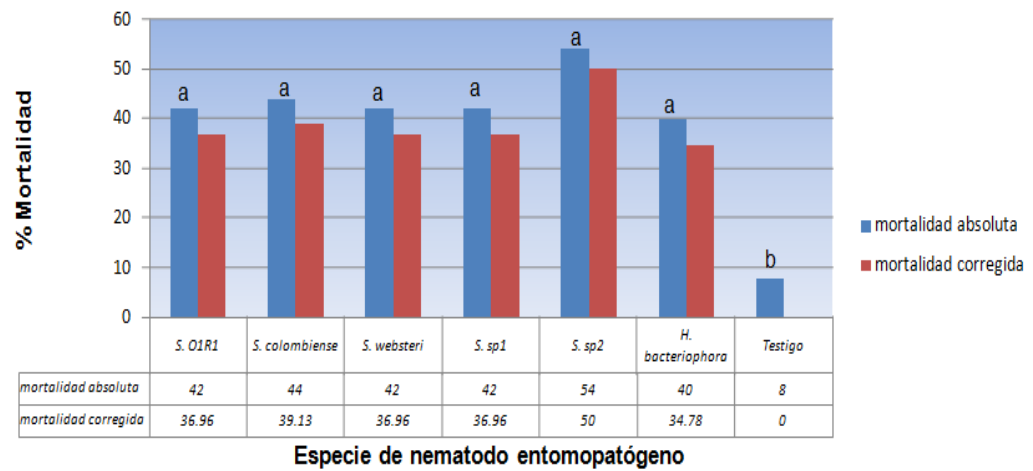


Figura 8. Porcentaje de mortalidad de adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

4.3 Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos sobre los instares de *A. varia*, bajo condiciones de invernadero

4.3.1 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de I instar.

Se presentó mortalidad con la especie *H. bacteriophora* en ninfas de I instar registrándose este efecto hasta cuando las ninfas se encontraban en III instar. No se presentó mortalidad con las otras especies de nematodos evaluadas, ni en el testigo (Figura 9). La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez y coloración rojiza (Figura 10). Las ninfas muertas de I instar se disecaron y se encontró en su interior en promedio 1 y 5 JI en las dosis de 100 y 1500 JI/cm², respectivamente.

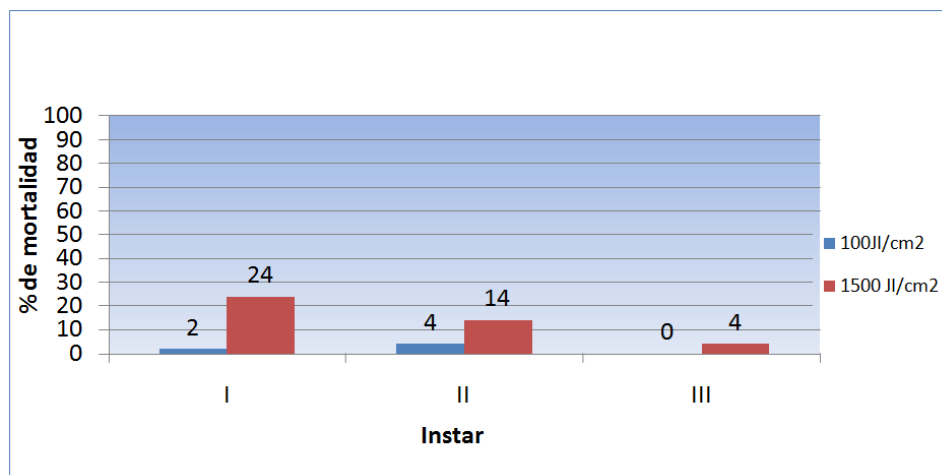


Figura 9. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *A. varia* infectadas con dos dosis de *Heterorhabditis bacteriophora*

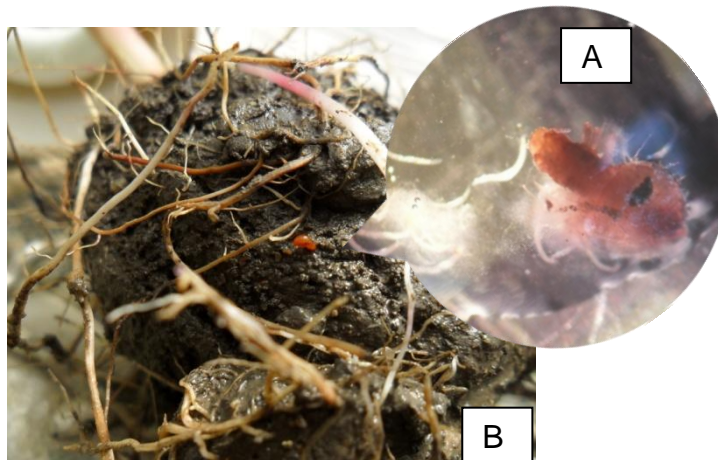


Figura 10. A). Ninfa de *A. varia* de I instar infectada con *H. bacteriophora*; **B).** Nematodos observados al estereoscopio que se encontraban en el interior del cuerpo de una ninfa infectada por *H. bacteriophora*.

Las ninfas que sobrevivieron continuaron su desarrollo realizando observaciones hasta el estado adulto. Al llegar a V instar, las plántulas se introdujeron en un cilindro de acetato (Figura 11). En el momento en que los insectos mudaron a adultos, se alimentaron de las hojas y se observaron durante 6 días. Al cabo de este tiempo sólo se observó mortalidad en el tratamiento con el nematodo O1R1, causando 16% y 8% con las dosis d1 y d2, respectivamente. Sin embargo, al disecar estos insectos no se encontraron nematodos en su interior.

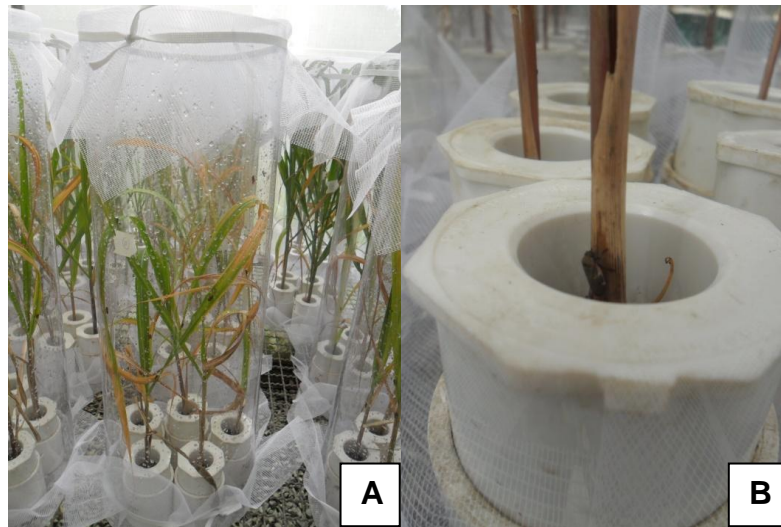


Figura 11. A). Detalles del bioensayo utilizado; **B).** Adulto de *A. varia* que una vez emergido se desplaza a las hojas de la caña de azúcar.

Para confirmar la viabilidad de los nematodos en el suelo aplicado, se emplearon larvas de *G. mellonella*, como controles positivos al terminar la evaluación (Figura 12). A las 72 h de colocadas las larvas se registró mortalidad baja sugiriendo que estos nematodos murieron o fueron lavados con el agua de riego durante el tiempo que tomó la evaluación (36 días) (Cuadro 4). Esto puede explicar los resultados obtenidos en los adultos de *A. varia*.

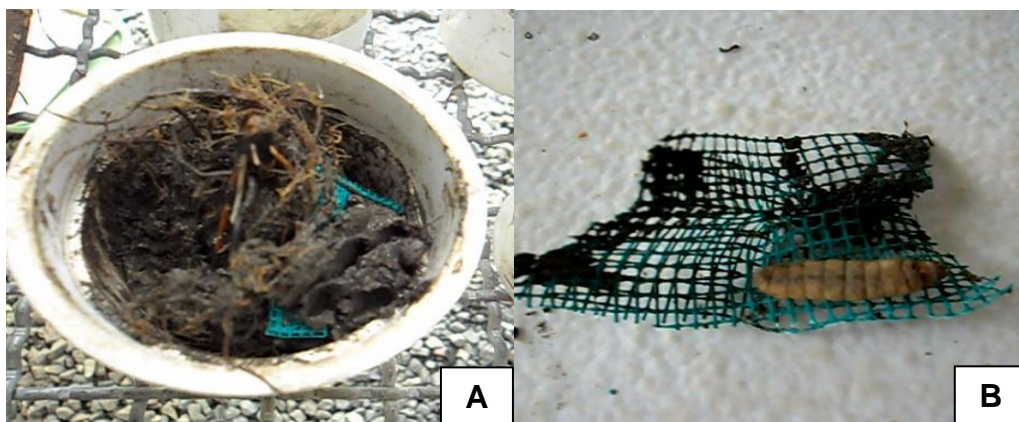


Figura 12. Sobrevivencia y patogenicidad de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo en invernadero, 36 días después de aplicados los nematodos. A). Detalles del ensayo; **B).** Larva de *G. mellonella* afectada por nematodos entomopatógenos.

Cuadro 4. Mortalidad de *G. mellonella* provocada por los nematodos entomopatógenos que se encontraban en el suelo 36 días después de la aplicación.

Especie de nematodo	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>G. mellonella</i>	
	D1: 100 JI/cm ²	D2: 1500 JI/cm ²
<i>Steinernema websteri</i>	10	20
<i>Steinernema sp2</i>	15	15
<i>Steinernema sp1</i>	20	30
<i>Steinernema colombiense</i>	30	30
<i>Steinernema O1R1</i>	20	30
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0	10

4.3.2 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de II instar.

La especie *H. bacteriophora* causó una mortalidad de 2 y 18% con d1 y d2, respectivamente en ninfas de II instar. Cuando el insecto se encontraba en III instar la mortalidad fue de 16% con d2. No se presentó mortalidad con las otras especies de nematodos evaluadas ni en el testigo. La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez y coloración rojiza. Las ninfas muertas de II instar se disecaron verificando la presencia de nematodos con un promedio de 1 y 4 JI en las dosis de 100 y 1500 JI/cm², respectivamente.

4.3.3 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de III instar.

Los resultados mostraron que solo dos especies de nematodos fueron capaces de parasitar ninfas de III instar pero a pesar de la altas concentraciones de nematodos evaluados, la mortalidad fue baja (Figura 13). El testigo, no presentó mortalidad durante el tiempo que tomó la evaluación.

La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez, y coloración rojiza para el caso de *H. bacteriophora*. Las ninfas muertas se disecaron verificando la presencia de nematodos en su interior. 3, 2 y 2 JI penetraron el cuerpo del insecto en promedio para O1R1 d1 y las dos dosis de *H. bacteriophora*.

Se presentó una mortalidad de 100% de las larvas de *G. mellonella* provocada por los nematodos entomopatógenos que se encontraban en el suelo demostrándose

así la sobrevivencia y virulencia de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo.

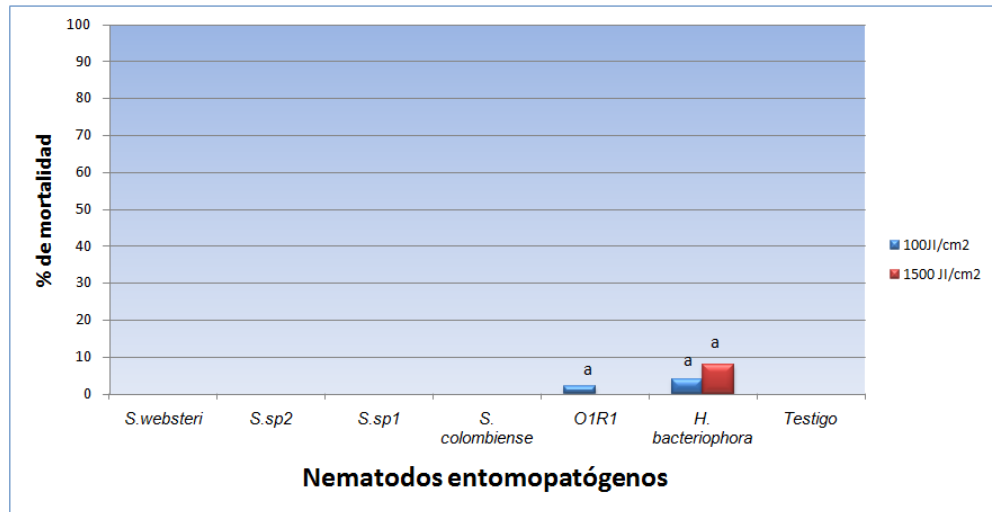


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de ninfas de III instar de *A. varia* infectadas con dos dosis de nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

4.3.4 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de IV instar.

De acuerdo al análisis de varianza, se presentaron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de mortalidad entre las especies de nematodos ($P = 0.0001$), sin embargo no hubo diferencias estadísticas significativas entre dosis evaluadas para cada especie ($P = 0.9984$).

Los tratamientos con mayor porcentaje de mortalidad correspondieron a *H. bacteriophora*, obteniéndose mortalidades de 89.13 y 84.78 % para las dosis 1 y 2 respectivamente, mientras que los tratamientos con *S. colombiense*, *O1R1* y *S. websteri* no superaron el 15% en la mortalidad (Figura 14). El testigo, presentó una mortalidad de 8%. En general el mayor porcentaje de ninfas muertas se presentó entre las 48 y 96 horas después de la infección.

Un aumento en la dosis de los nematodos no necesariamente significó un aumento en los porcentajes de mortalidad, incluso se presentaron mortalidades más altas en la dosis menor (Figura 14).

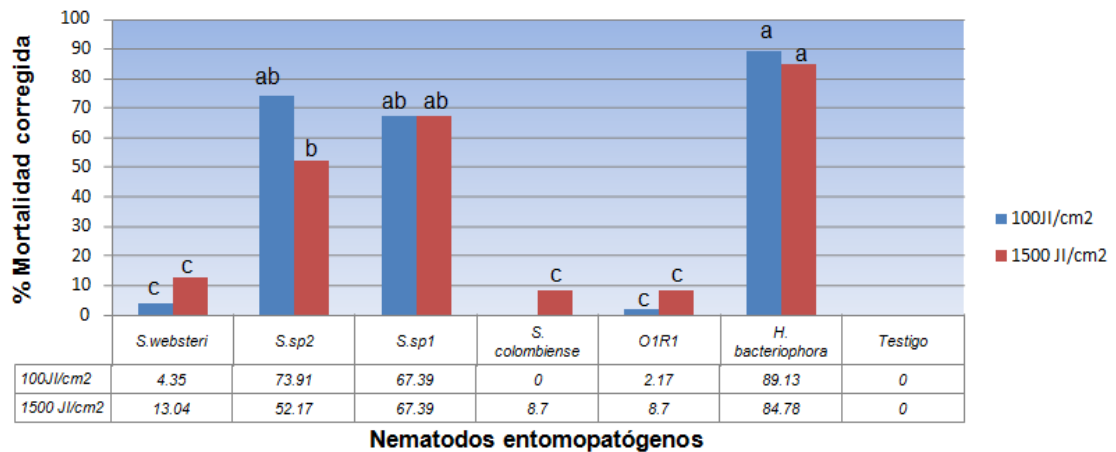


Figura 14. Porcentaje de mortalidad de ninfas de IV instar de *A. varia* infectadas con dos dosis de nematodos entomopatogénos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez y coloración rojiza para el caso de *H. bacteriophora* (Figura 15). El 50% de las ninfas muertas se disecaron verificando la presencia de nematodos en su interior que varió con d1 entre 1 y 18 JI y con d2 entre 1 y 13 JI (Cuadro 5). El 50% restante se colocaron en cámara White para evaluar la multiplicación de los nematodos, observándose que en todos los tratamientos se presentó emergencia de nematodos de las ninfas más no en todos los individuos. La mayor producción de JI se presentó con *H. bacteriophora* con un promedio de 4066 y 4061 JI/ninfa para d1 y d2, respectivamente (Cuadro 6).

Para confirmar la persistencia de los nematodos, se emplearon larvas de *G. mellonella* como controles positivos al terminar la evaluación de los tratamientos sobre el suelo empleado. Este tipo de control, presentó mortalidades del 100% de los insectos a las 48 horas, demostrándose la sobrevivencia y virulencia de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo.



Figura 15. Ninfa de IV instar de *A. varia* muerta por efecto de nematodos entomopatógenos.

Cuadro 5. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de IV instar de *A. varia*

Nematodo	JI que penetraron el cuerpo del insecto	
	D1: 100 JI/cm ²	D2: 1500 JI/cm ²
<i>Steinernema websteri</i>	1	1
<i>Steinernema sp2</i>	3	13
<i>Steinernema sp1</i>	1	4
<i>Steinernema colombiense</i>	18	1
<i>Steinernema O1R1</i>	3	3
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	4	4

Cuadro 6. Promedio de juveniles infectivos emergidos de ninfas de IV instar de *A. varia*

Nematodo	JI producidos	
	D1: 100 JI/cm ²	D2: 1500 JI/cm ²
<i>Steinernema websteri</i>	220	240
<i>Steinernema sp2</i>	1000	1370
<i>Steinernema sp1</i>	520	1247
<i>Steinernema colombiense</i>	2773	2305
<i>Steinernema O1R1</i>	943	1098
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	4066	4061

4.3.5 Virulencia de nematodos entomopatógenos sobre ninfas de V instar.

De acuerdo con el análisis de varianza, se presentaron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de mortalidad entre las especies de nematodos ($P=0.0060$) y en las dosis ($P=0.0089$).

Los mayores porcentajes de mortalidad se obtuvieron con la dosis más alta (1500 JI/cm^2), destacándose *H. bacteriophora*, *S. colombiense* y O1R1 con valores de 20, 18 y 18%, respectivamente. Con la dosis de 100 JI/cm^2 la mortalidad en las ninfas en todos los casos fue inferior al 10% (Figura 16).

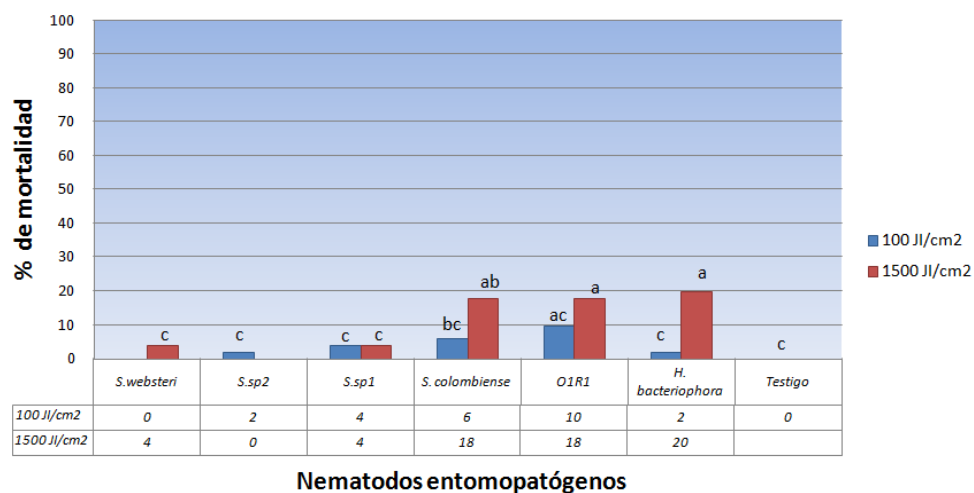


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con dos dosis de nematodos entomopatógenos. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

La sintomatología observada en las ninfas muertas fue flacidez, malformación, detención de la metamorfosis a adulto y coloración rojiza para el caso de *H. bacteriophora* (Figura 17A). Las ninfas muertas se disecaron verificando la presencia de nematodos en su interior que fluctuó con d1 entre 1 y 2 JI y con d2 entre 1 y 21 JI (Cuadro 7).

Las ninfas que sobrevivieron continuaron su desarrollo hasta el estado adulto. En este estado se observó una mortalidad del 100%, la cual ocurrió al cabo de 1 a 3 días después de su transformación a adulto confirmándose los resultados obtenidos en laboratorio (Figura 17B).

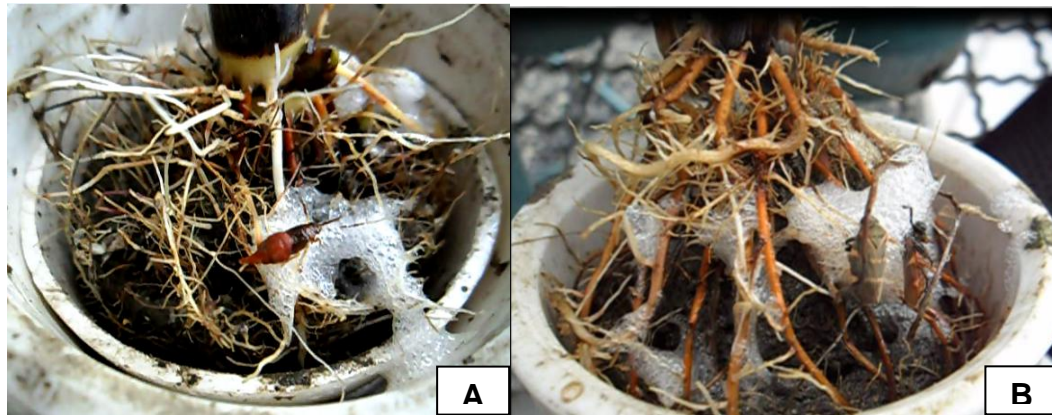


Figura 17. Ninfas y Adultos de *A. varia* infectados con nematodos entomopatógenos. **A).** Ninfa de V instar de *A. varia* muerta por efecto de *H. bacteriophora*; **B).** Adultos de *A. varia* muertos por efecto de nematodos entomopatógenos.

Cuadro 7. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de V instar de *A. varia*

Nematodo	JI que penetraron el cuerpo del insecto	
	D1: 100 JI/cm ²	D2: 1500 JI/cm ²
<i>Steinernema websteri</i>	0	2
<i>Steinernema sp2</i>	1	0
<i>Steinernema sp1</i>	2	21
<i>Steinernema colombiense</i>	1	3
<i>Steinernema O1R1</i>	2	1
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	1	5

La mortalidad al terminar el estado ninfal V aparentemente es baja, pero cuando se continuó la observación sobre las ninfas que sobrevivieron hasta el estado adulto, se encontró que todos murieron por infección de los nematodos, o sea, la mortalidad fue del 100% para todas las especies al cabo de 3 días. Esto indica que aplicaciones de los nematodos cuando el insecto está en V instar, pueden reducir considerablemente la población. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los adultos permanecieron confinados sin darle la oportunidad de continuar con su hábito alimenticio en las hojas y de esta manera se obligaron a estar en contacto con los nematodos.

Considerando lo anterior se repitió el experimento para corroborar los resultados de la susceptibilidad de ninfas de V instar de *A. varia* a los nematodos entomopatógenos y una vez se inició la emergencia de adultos, las plantas se colocaron en el interior de un cilindro de acetato.

En el Cuadro 8, se registra la mortalidad que se presentó en el ensayo I y II. En ambos ensayos se observó un comportamiento similar para todas las especies evaluadas.

Heterorhabditis Gua 31 se aisló al finalizar los ensayos por lo tanto no se evaluó en el ensayo I. Este aislamiento causó una mortalidad de 40% sobre ninfas de V instar muy superior a las otras especies evaluadas por lo tanto se considera promisorio para avanzar con la selección de nematodos para el control de *A. varia*.

Cuadro 8. Mortalidad (%) de ninfas de V instar de *A. varia* infectadas con diferentes especies de nematodos entomopatógenos en dos dosis: d1: 100 JI/cm² y d2: 1500 JI/cm²

Nematodos	Ensayo I		Ensayo II	
	d1	d2	d1	d2
<i>Steinernema</i> 01R1	10	18	8	14
<i>Steinernema colombiense</i>	6	18	4	12
<i>Steinernema websteri</i>	0	4	6	6
<i>Steinernema</i> sp1	4	4	6	6
<i>Steinernema</i> sp2	2	0	2	2
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	2	20	12	28
<i>Heterorhabditis</i> Gua 31	---	---	26	40
Testigo	0	0	0	0

En las observaciones sobre la población de ninfas que alcanzaron el estado adulto, en el momento en el que mudaron sobrevivieron y se alimentaron del follaje durante 6 días, tiempo en el cual se registró el parasitismo (presencia de nematodos en el interior de los adultos muertos). Solo se presentó parasitismo en los tratamientos con dosis más alta destacándose nuevamente *Heterorhabditis* Gua 31 y *H. bacteriophora* con 50 y 47.2 %, respectivamente (Cuadro 9).

Cuadro 9. Parasitismo de nematodos en adultos de *A. varia* infectados en el V instar ninfal

Especie de nematodo	% parasitismo en adultos de <i>A. varia</i>	
	D1: 100 JI/cm ²	D2: 1500 JI/cm ²
<i>Steinernema</i> O1R1	0	16.2
<i>Steinernema colombiense</i>	0	18.2
<i>Steinernema websteri</i>	0	12.7
<i>Steinernema</i> sp1	0	8.5
<i>Steinernema</i> sp2	0	16.3
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0	47.2
<i>Heterorhabditis</i> Gua 31	0	50

Al sumar la mortalidad presentada en ninfas de V instar y el estado adulto se obtuvo una reducción total de la población entre 14.5 y 90% con las especies *Steinernema* sp1 y el aislamiento *Heterorhabditis* Gua 31 respectivamente.

Las larvas de *G. mellonella* empleadas como controles positivos al terminar los ensayos, presentaron una mortalidad del 100% a las 48 horas, demostrándose la sobrevivencia y virulencia de los nematodos bajo las condiciones del bioensayo.

4.4 Capacidad de búsqueda de nematodos entomopatógenos hacia *A. varia*

Se presentaron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de recuperación de los nematodos en las secciones de atracción y estático (P= 0.0001, P= 0.0002, respectivamente) pero no en repulsión (P= 0.1915). La mortalidad de las ninfas presentó diferencias entre especies (P= 0.0006).

Se recuperaron juveniles infectivos en las tres distancias o secciones evaluadas. Todas las especies fueron atraídas y causaron mortalidad a las ninfas de *A. varia*, destacándose *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1 al causar mortalidades del 46% y 30% (Figura 18), con desplazamientos de 56.3% y 77.4%, respectivamente. La menor mortalidad se presentó con O1R1, con 10 % y una repulsión de 19,3% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de nematodos entomopatógenos que se desplazaron con respecto a *A. varia*. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

Desplazamiento %	<i>S. websteri</i>	<i>S. sp2</i>	<i>S. sp1</i>	<i>S. colombiense</i>	<i>S. O1R1</i>	<i>H. bacteriophora</i>
Atracción	75.3ab	65.6abc	77.4 ^a	55.4c	54.8c	56.3bc
Estático	14.7c	19abc	16.3bc	33.3 ^a	25.8abc	30.8ab
Repulsión	9.3 ^a	15.2 ^a	6.1 ^a	11.2 ^a	19.3 ^a	12.7 ^a

Al diseccionar las ninfas muertas cinco días post infección se encontraron nematodos en diferentes estados como J4 y adultos de primera generación. El número de J1 que lograron penetrar el cuerpo del insecto fluctuó entre 3 y 10 (Cuadro 11).

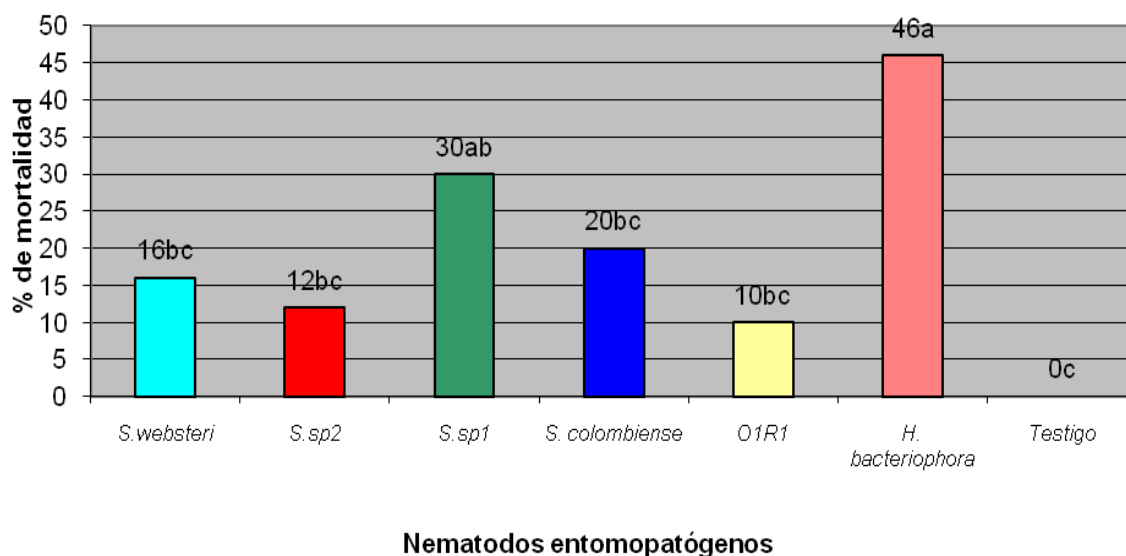


Figura 18. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *A. varia* causada por los nematodos entomopatógenos que fueron atraídos al insecto. Letras iguales no difieren ($P < 0.05$)

Cuadro 11. Promedio de juveniles infectivos que penetraron el cuerpo de ninfas de IV instar de *A. varia*

Nematodo	Jl que penetraron el cuerpo del insecto
<i>Steinernema websteri</i>	9
<i>Steinernema sp2</i>	10
<i>Steinernema sp1</i>	4
<i>Steinernema colombiense</i>	7
<i>Steinernema O1R1</i>	3
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	8

5. DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos

Del total de las muestras evaluadas (240) sólo el 0.8 % presentó nematodos. El bajo porcentaje de NEP recuperados es comparable al de otros estudios en diferentes regiones del mundo que muestran resultados entre 0.9% a 30% (Mason *et al.*, 1996; Midityuri *et al.*, 1997; Constant *et al.*, 1998; Tangchitsomkid y Sontirat, 1998; Stock *et al.*, 1999; Griffin *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2000; Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001; Hazir *et al.*, 2003; Canhilal *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2008). En el caso específico de Colombia, se registran porcentajes de recuperación de 33 y 45% de dos sitios diferentes de 193 muestras de suelo (Caicedo, *et al.*, 2004), también Melo *et al.* (2004) registra recuperación de nematodos de 6.6% de 320 muestras de suelo evaluadas de regiones de Colombia y Panamá y López *et al.* (2007) registra que de un total de 945 muestras de suelo, 3% fueron positivas a nematodos entomopatógenos.

Hominick (2002) registra que los steinernematidos generalmente se recuperan con mayor frecuencia que los heterorabditidos. En el presente estudio, los dos aislamientos recuperados de las muestras de suelo corresponden a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae.

Por otro lado, Kaya (1990) menciona que suelos livianos (arenosos, franco-arenosos) permiten la persistencia de JI por períodos prolongados de tiempo, mientras que en los suelos arcillosos los JI no prosperarían (Kaya, 1990). Sin embargo, algunos autores señalan que el tipo de suelo no condiciona la presencia de nematodos entomopatógenos (Constant *et al.*, 1998; Doucet *et al.*, 2001) lo que está acorde a los resultados del presente estudio donde se aislaron nematodos de suelos con una textura franco arcillosa (El Puerto) y arcillosa (La Colombina).

5.2 Prueba de selección por patogenicidad de los nematodos entomopatógenos a *A. varia* bajo condiciones de laboratorio

Los resultados revelan que el estado ninfal V y adulto de *A. varia* son susceptibles a todas las especies de nematodos evaluadas bajo condiciones de laboratorio, siendo más susceptible el estado adulto con una mortalidad de 100% cuando se

encuentra en contacto permanente con los nematodos, es decir, en el caso específico del bioensayo donde se empleó cajas de Petri (Figura 5).

Gaugler *et al.* (1997) menciona que en una caja Petri las condiciones físicas son ideales y el contacto huésped-parásito está asegurado, mientras que los nematodos cuando se aplican sobre el follaje son rápidamente inactivados por la desecación, la radiación solar, y temperaturas extremas. Caso similar sucedió con el bioensayo en el que se emplearon cilindros de acetato donde los adultos tenían menos probabilidad de contacto con los nematodos debido a que se encontraban alimentándose del follaje y donde los nematodos se desecaban rápidamente y no se podían mover con la facilidad que le suministraba el suelo el cual se encontraba a capacidad de campo y sobre el cual también se asperjó nematodos. Así pues, la interacción del adulto con el nematodo sucedió en el momento de la aspersión al follaje y cuando este insecto se desplazaba a ovipositar al suelo, esto se reflejó en la mortalidad que fluctuó entre 40 y 54% (Figura 7).

Es evidente, la importancia del sistema de bioensayo que se emplea para determinar el efecto de un organismo sobre un insecto y sobre el estado de desarrollo del mismo teniendo en cuenta factores como el comportamiento del hospedero entre otros. En ese sentido, Glazer y Lewis (2000) mencionan que el desarrollo de procedimientos estandarizados para medir la virulencia de nematodos es un factor clave en la utilización eficaz de nematodos entomopatógenos como agentes biológicos.

Los resultados positivos de susceptibilidad de adultos en condiciones de laboratorio sugieren que los nematodos entomopatógenos pueden emplearse en el control de adultos de *A. varia*. De esta manera, se podría esperar bajo condiciones de campo que los nematodos actúen sobre la emergencia de adultos donde podría ser infectado durante la oviposición o cuando estos insectos tomen refugio en el suelo.

Con respecto al estado ninfal V, se presentó una baja mortalidad la cual osciló entre 3% con *Heterorhabditis bacteriophora* y 17% con *Steinernema websteri* (Figura 3). Cabe señalar que este estado de desarrollo una vez inicia su alimentación produce una espuma o saliva muy densa y permanece dentro de ella, de tal manera que puede funcionar como una barrera física para la entrada del nematodo, además de la frecuente defecación de ésta que puede expulsar a los nematodos. En este aspecto, tanto las cigarras como el salivazo se registran expulsando líquidos anales hacia animales que se aproximan o cuando se les molesta (Stehr, 1987). Por lo tanto, la defecación se considera como una defensa directa contra enemigos naturales donde los insectos usan activamente su propio material fecal para disuadir o repeler a sus potenciales enemigos (Weiss, 2006).

Es de anotar, que las aplicaciones de nematodos entomopatógenos realizadas en V instar con el sistema de bioensayo de cajas Petri confirmaron los resultados de

las evaluaciones sobre el estado adulto, donde una vez las ninfas se transformaron a adultos entraron en contacto con los nematodos ocasionando una reducción total de la población.

En cuanto a la penetración de los nematodos evaluados sobre *A. varia* éstos lograron entrar al cuerpo de las ninfas y adultos. El promedio de JI dentro de las ninfas no se correlacionó con el porcentaje de mortalidad tal como se presentó con *Steinernema* sp2 con un promedio de 28 JI/ ninfa y una mortalidad de 10%, en cambio *S. websteri* presentó un promedio de 7 JI/ ninfa y ocasionó una mortalidad de 17%.

Con referencia a la multiplicación, se realizó observaciones sólo sobre el estado adulto que se evaluó en el bioensayo de cajas Petri la cual fue influenciada por la especie de nematodo y no se correlacionó con el promedio de JI que penetraron el insecto. Así pues, la alta producción por *H. bacteriophora* (30201 JI/adulto) fue muy superior a la producida por *Steinernema* sp1 (3676 JI/adulto) (Cuadro 3) con un promedio de 32 y 39 JI en el interior del insecto, respectivamente.

5.3 Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos sobre los instares de *A. varia*, bajo condiciones de invernadero

Las evaluaciones realizadas sobre los diferentes estados ninfales de *A. varia* con dos dosis de aplicación de nematodos entomopatógenos bajo condiciones de invernadero revelaron que estos organismos son capaces de matar e infectar el estado ninfal de este insecto como lo registrado por Ferrer *et al.* (2004), y con diferentes grados de virulencia dependiendo del estado de desarrollo.

Los resultados indican que hay diferencias significativas entre las especies ($P < 0.05$), lo que permite realizar una selección de las especies más virulentas para ser evaluadas en ensayos posteriores en campo. La selección de las mejores especies de nematodos para una plaga en particular es importante, ya que hay grandes diferencias en la virulencia de las especies de nematodos contra diferentes especies de plagas (Grewal *et al.*, 2005).

Las ninfas de IV instar fueron más susceptibles a la infección por nematodos con mortalidades absolutas hasta de 90%. La mayor virulencia la presentó *H. bacteriophora*, *Steinernema* sp2 y *Steinernema* sp1 con mortalidades corregidas de 89.1, 73.9 y 67.4 % respectivamente con 100 JI/cm² (Figura 13). La menor susceptibilidad la presentó el estado ninfal III con mortalidades entre 2% con *Steinernema* O1R1 y 8% con *H. bacteriophora* con dosis de 100 y 1500 JI/cm² respectivamente (Figura 12).

Esta susceptibilidad asociada a la edad se podría atribuir al tamaño de los orificios naturales que son punto de entrada de los nematodos entomopatógenos en los insectos (boca, ano y espiráculos) (Tanada y Kaya, 1993) y que en las ninfas de I, II y III instar debido a su pequeño tamaño y además a que posee un aparato bucal chupador podrían dificultar o impedir la penetración de los nematodos. Existen varios estudios al respecto en otros insectos donde mencionan que el ancho de las aberturas (boca y ano) pueden excluir a los juveniles infectivos de algunos insectos como los chupadores o instares jóvenes de masticadores (por ejemplo en el gusano alambre) (Eidt y Thurston, 1995). Jackson y Brooks (1995) también mencionan que en larvas jóvenes de *Diabrotica virgifera* el diámetro menor de los espiráculos fue una barrera para la entrada de *Steinernema carpocapsae*.

En el caso específico del género *Heterorhabditis*, éste presenta una ventaja morfológica sobre *Steinernema*, por el diente terminal que posee, con el que raspa las áreas intersegmentales de la cutícula del insecto, facilitando la entrada por más partes del cuerpo (Ishibashi y Kondo 1990) y por tanto podría explicar porque *H. bacteriophora* evaluada en este estudio causó la mayor mortalidad en todos los estados ninfales y fue la única especie que afectó a las ninfas de I y II instar (Figura 8).

Por otra parte, la menor producción de CO₂ y kairomonas en estados jóvenes de insectos dificulta que los nematodos encuentren su hospedero (Kaya 1985). De modo similar, podría estar actuando en las ninfas de I, II y III instar de *A. varia*.

En lo que se refiere al estado ninfal V, este produce una espuma o saliva muy densa que pudo haber funcionado como una barrera física para la entrada del nematodo, además de la frecuente defecación de ésta que pudo haber expulsado a los nematodos y disminuir la infección anal. En otros insectos como gusanos y larvas de la mosca de sierra se presenta una situación similar donde la frecuente defecación expulsa a los nematodos (Georgis y Hague, 1981; Cui *et al.*, 1993). Así pues, la defecación puede ser considerada como una defensa directa de los insectos para disuadir a sus potenciales enemigos (Weiis, 2006).

Adicionalmente, el grosor de la cutícula y el sistema inmunológico desempeñan un papel importante en la susceptibilidad de los insectos (Jackson y Brooks, 1995; Koppenhöfer y Fuzy, 2004;). En este estado de desarrollo (V instar) la cutícula de la ninfa es más gruesa y el sistema inmune más desarrollado lo que podría haber afectado todo el proceso de infección, derivando en la disminución de la mortalidad como se presentó incluso en *H. bacteriophora* (20%) (Figura 15). Sin embargo, las aplicaciones de nematodos entomopatógenos realizadas en este estado ninfal, pueden reducir considerablemente la población si se suma la mortalidad producida cuando emergen a adultos (Cuadro 9).

Entre tanto, las ninfas de IV instar, las cuales fueron más susceptibles a la infección por nematodos con mortalidades absolutas hasta de 90%, se podrían

considerar como un estado intermedio en donde los factores como las aberturas naturales, la defecación, el grosor de la cutícula, el sistema inmune, la producción de CO₂ y kairomonas no fueron un limitante para que los nematodos causaran infección. Todos estos aspectos son especulaciones que no se deben generalizar y sobre los cuales se deberían realizar estudios más profundos que permitan dilucidar los mecanismos de acción que hacen que ninfas de IV instar sean más susceptibles y si este comportamiento ocurre para las diferentes especies de salivazos y nematodos entomopatógenos.

De modo similar, varios estudios se han llevado a cabo en otros insectos para determinar el estado de desarrollo más susceptible a los nematodos entomopatógenos y se ha encontrado algunas diferencias entre ellos. Cabe mencionar los realizados por Koppenhöfer y Fuzy (2004) donde la eficacia de *H. bacteriophora* disminuyó con el aumento de la edad de *Anomala orientalis* pero no difirió significativamente entre los estados larvales de *Popillia japonica*. Por el contrario, Jackson y Brooks (1995) registra a los estados iniciales de *Simulium vittatum*, menos susceptibles a nematodos entomopatógenos (58%) que los más desarrollados (97%). En otros estudios con *Cyrtomenus bergi* ocurrió lo mismo, siendo el estado de adulto y el quinto más susceptibles que los primeros (Caicedo y Bellotti 1994; Barberena y Bellotti 1998; CIAT 2003b).

En lo que concierne a la dosis, se presentaron diferencias significativas en las mortalidades registradas en los ensayos de I, II y V instar de *A. varia* con *H. bacteriophora* (Figuras 8 y 15). En las evaluaciones sobre IV instar no se encontró diferencias significativas entre dosis para cada especie (Figura 13). Más aún, la respuesta en la mortalidad de los insectos en función del aumento de la dosis fue baja o nula en algunas especies de nematodos, incluso se presentaron mortalidades más altas en la dosis menor como la que presentó *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp2.

Observaciones similares fueron registradas por Ferrer *et al.* (2004) en la efectividad del nematodo *H. bacteriophora* para controlar ninfas de *A. varia*, quienes no encontraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de 71,4; 75,4 y 75,3 para los tratamientos de 100, 75 y 50 millones de nematodos/ha, respectivamente. Del mismo modo, Leite *et al.* (2005) no encontraron diferencias significativas en la mortalidad de ninfas de *M. fimbriolata* entre las dosis empleadas 6.6×10^7 y 3.3×10^9 JI/ha con *Heterorhabditis* sp., con un control de 74% bajo condiciones de campo. Igualmente con otras especies de nematodos *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravis* y *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, Batista y Machado (2010), no encontraron diferencias significativas en la mortalidad de ninfas de *M. spectabilis* en función de la concentración empleada 2000 y 4000 JI/ml. Contrariamente, Alves, Rohde y Alves (2005) registran que una concentración de *S. carpocapsae* ARO de 60 JI / larva de *Alphitobius diaperinus* es menos eficiente que 120 JI/ larva con mortalidades de 17 y 48%, respectivamente.

Cabe resaltar que las dosis empleadas en este estudio son superiores a las de otros estudios como los citados anteriormente. Sin embargo, en otros insectos como *Diaprepes abbreviatus* y *Pachnaeus litus* se registran el uso de dosis similares que van desde 120 a 637 JI/cm² de *S. riobravis* y *H. bacteriophora* con un control de 90 y 76% (Downing *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 1996).

En cuanto a la penetración de los nematodos entomopatógenos y para el caso específico *H. bacteriophora* la cual causó la mayor mortalidad en todos los estados ninfales y fue la única especie que afectó a las ninfas de I y II instar no se observaron incrementos en el promedio de JI encontrados al interior del insecto al aumentar la edad de la ninfa y no se observó una correlación con el porcentaje de mortalidad. Así pues, en ninfas de I instar 1 y 5 JI en promedio entraron al cuerpo del insecto con mortalidades de 2 y 24 % en dosis de 100 y 1500 JI/cm², respectivamente y en ninfas de IV instar 4 JI penetraron el insecto causando mortalidades de 89.13 y 84.78 % en dosis de 100 y 1500 JI/cm², respectivamente.

En el caso de la multiplicación se realizaron observaciones sólo sobre ninfas de IV instar debido a que fue el instar donde se presentó la mayor mortalidad y por lo tanto el número de individuos muertos permitía hacer observaciones tanto de penetración como de multiplicación de los nematodos entomopatógenos evaluados.

Según Koppenhöfer y Kaya (1995) un incremento en las densidades de *Steinernema glaseri* en el suelo afectó la eficiencia en la penetración y multiplicación en larvas de *G. mellonella*. Sin embargo en el presente estudio la producción de nematodos en el hospedero no se correlacionó con el aumento de la dosis pero sí con la especie más virulenta. Así pues, la mayor producción fue registrada en *H. bacteriophora* con 4066 y 4061 JI/ninfa con dosis de 100 y 1500 JI/cm², respectivamente (Cuadro 6). Resultados similares fueron registrados por Leite *et al.* (2005) quienes observaron una correlación positiva entre la virulencia y la producción de JI en ninfas de *M. fimbriolata*.

El mayor promedio de producción que se observó en *H. bacteriophora* pudo haber ocurrido por la capacidad que posee este nematodo de multiplicarse con tan solo un nematodo que penetre en el cuerpo del insecto, ya que en su primera generación este es hermafrodita, a diferencia de las especies del género *Steinernema* que necesitan de un macho y una hembra para multiplicarse.

La multiplicación del nematodo dentro del insecto permitiría no solo afectar el estado susceptible si no que los nematodos que emerjan del cadáver podrían causar infecciones secundarias en otros estados como el adulto e incrementar el inóculo en campo.

Finalmente, las pruebas realizadas para confirmar la persistencia de los nematodos en el suelo muestran que al terminar las evaluaciones en los ensayos de I instar las mortalidades de *G. mellonella* (control positivo) son bajas (Cuadro 4) lo que sugiere que los nematodos murieron o fueron lavados con el agua de riego durante el tiempo que tomó la evaluación la cual fue de 36 días. No obstante, en los ensayos de III, IV y V instar (25, 19 y 11 días después, respectivamente) las mortalidades fueron de 100% con todas las especies de nematodos. Resultados similares fueron obtenidos por Ferrer *et al.* (2004) quienes observaron 95% de mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *H. bacteriophora* al realizar el trapeo 30 días después de finalizado el experimento sobre *A. varia* en campo.

Por lo tanto, la persistencia de los nematodos entomopatógenos evaluados en el presente estudio constituye una característica importante en el control biológico de este insecto debido a que una vez realizada la aplicación de estos organismos además de actuar en el momento de la aplicación también pueden efectuar control en los días posteriores sobre una posible emergencia de la plaga blanco o sobre la población remanente como ocurrió con *H. bacteriophora* sobre ninfas de I instar en la cual se presentó mortalidades en los siguientes instares (II y III) y cuando se realizaron aplicaciones sobre ninfas de II instar donde ejercieron control hasta III instar.

5.4 Capacidad de búsqueda de nematodos entomopatógenos hacia *A. varia*.

Se presentó diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de recuperación de los nematodos en las secciones de atracción y estático ($P=0.0001$, $P=0.0002$, respectivamente) pero no en repulsión ($P=0.1915$). La mortalidad de las ninfas presentó diferencias entre especies ($P=0.0006$).

Se recuperaron juveniles infectivos en las tres distancias o secciones evaluadas. Todas las especies fueron atraídas y causaron mortalidad a las ninfas de *A. varia*, destacándose *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1 al causar mortalidades del 46% y 30% (Figura 17), con desplazamientos de 56.3% y 77.4%, respectivamente. La menor mortalidad se presentó con O1R1, con 10% y una repulsión de 19,3% (Cuadro 10).

El desplazamiento registrado en este estudio pudo ser influido por la atracción de los nematodos hacia los volátiles presentes en la espuma o saliva que las ninfas expulsan una vez inician su alimentación. En este sentido, Grewal *et al.* (1993) investigaron la respuesta conductual de nematodos entomopatógenos a las heces de hospedantes naturales y de hospedantes de laboratorio y encontraron que los JI de *H. bacteriophora* y *S. glaseri* respondieron positivamente.

Por otra parte, las raíces de las plantas desempeñan un papel importante en la atracción de los nematodos ya sea por el CO₂, los compuestos que estas exudan o por compuestos volátiles emitidos en respuesta al ataque de insectos. Al respecto, Gaugler *et al.* (1980) señalan que los juveniles infectivos de *Steinernema carpocapsae* son atraídos por el CO₂ liberado tanto de las raíces de las plantas como de los insectos hospedantes que se alimentan de éstas. También fue demostrado por Rasmann *et al.* (2005) que en las raíces de variedades europeas de maíz, al ser devoradas por las larvas de *Diabrotica virgifera virgifera*, emiten sesquiterpeno (E)- β -cariofileno y que este compuesto atrae a *H. megidis*.

A pesar que *S. websteri* fue la especie que más se recuperó en la sección donde se encontraban las ninfas de *A. varia*, no ocasionó la mayor mortalidad lo que sugiere que la atracción no es suficiente para causar una alta infección ya que existen otros factores interviniendo en la interacción con el insecto como por ejemplo la espuma que puede ser una barrera física para el nematodo. Estos resultados nuevamente confirman las diferencias en la virulencia de las especies de nematodos entomopatógenos contra *A. varia*.

Hay que añadir que el suelo empleado en este estudio presentaba una textura arcillosa que no fue un impedimento para que los nematodos se desplazaran hacia *A. varia*. Contrario a esto, algunos autores como Portillo *et al.* (1999) señalan que una densidad alta afecta el desplazamiento y sobrevivencia de los JI, por el reducido tamaño de poro, lo cual impide su desplazamiento hacia el hospedante.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos nuevos aislamientos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* provenientes del municipio de Oiba (Santander) y Guática (Risaralda), respectivamente las cuales se encuentran almacenadas en esponjas de polieter poliuretano en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) y el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña).
- Los nematodos entomopatógenos evaluados penetraron el cuerpo de las ninfas y adultos de *A. varia*, se multiplicaron y causaron porcentajes variables de mortalidad. El mayor control en todos los instares ocurrió con *H. bacteriophora*.
- La menor susceptibilidad la presentó el estado ninfal III y la mayor en el estado ninfal IV. Las especies con mayor virulencia sobre éste fueron *H. bacteriophora*, *Steinernema* sp2 y *Steinernema* sp1 que presentaron mortalidades de 89.1, 73.9 y 67.4% respectivamente con la menor dosis.
- Los nematodos entomopatógenos evaluados presentaron búsqueda activa de ninfas de *A. varia* y lograron penetrar el cuerpo del insecto destacándose *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1 con los mayores porcentajes de mortalidad 46 y 30%, respectivamente.

7. RECOMENDACIONES

- Tomando en consideración los resultados obtenidos con relación a la mortalidad, penetración, potencial reproductivo y capacidad de búsqueda se considera a *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp1 con potencial para ser evaluados en el control de *A. varia* bajo condiciones de campo en cultivos de caña comerciales.
- Evaluar bajo condiciones de invernadero el aislamiento *Heterorhabditis* Gua 31 y ampliar la búsqueda de nuevos aislamientos con miras a obtener una mayor virulencia sobre ninfas de *A. varia*.
- Evaluar la virulencia de especies de nematodos entomopatógenos en otras especies de salivazo.
- Evaluar el impacto de los nematodos entomopatógenos en los enemigos naturales de *A. varia*.
- Estimar el costo de producción y aplicación de los nematodos entomopatógenos en campo.
- Realizar la caracterización morfológica y molecular de los nuevos aislamientos.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, B. J. and NGUYEN, K. B. 2002. Taxonomy and Systematics. In: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). p. 311-326.

AKHURST, R. and SMITH, K. 2002. Regulation and Safety. In: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). p. 311-326.

ALLARD, G. B. 1987. Prospects for the biocontrol of sugar cane froghopper with particular reference to Trinidad. Biocontrol News and Information. Vol. 8: (2). p.105-115.

ALVES, L. F. A., ROHDE, C., and ALVES, V. S. 2005. 'Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)', Neotropical Entomology. Vol. 34 (1). p. 139-141.

ARANGO, G.; CALDERON, M. 1981. Biología y comportamiento de *Zulia colombiana* (Lallemand) plaga del pasto *Brachiaria* spp. Revista Colombiana de Entomología. Vol. 7(1/2). p. 3-11.

ASOCIACIÓN DE CULTIVADORES DE CAÑA DE AZÚCAR DE COLOMBIA (Asocaña). Informe anual 2008-2009. Sector Azucarero Colombiano. Disponible en: www.asocana.org. Último acceso 22/04/2011.

ASOCIACIÓN DE CULTIVADORES DE CAÑA DE AZÚCAR DE COLOMBIA (Asocaña). Informe anual 2009-2010. Sector Azucarero Colombiano. Disponible en: www.asocana.org. Último acceso 22/04/2011.

BARBERENA, M. F.; BELLOTTI, A. C. 1998. Parasitismo de dos razas del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre la chinche *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) en laboratorio. Revista Colombiana de Entomología. Vol. 24 (1-2). p. 7-11.

BATISTA, E. S. P and MACHADO, A. A. 2010. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). Biocontrol Science and Technology, Vol. 20 (10). p. 1079-1085.

BEEDING, R. A.; AKHURST, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematológica (Holanda) 21: 109 - 110.

- BENNETT, F. D. 1984. Discusión sobre las posibilidades de control biológico de la candelilla. *In* Seminario Problemas de la candelilla y el taladrador de la caña de azúcar y pastos (Barquisimeto, 1984). Unión de productores de azúcar. p. 39-48.
- BOEMARE, N. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *In*: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). p. 311-326.
- BYERS, R. A. and WELLS, H. D. 1966. Phytotoxemia of coastal bermudagrass caused by the two-lined spittlebug, *Prosapia bicincta* (Homoptera: Cercopidae). *Annals Entomol. Soc. Amer.* Vol. 59 (6). p. 1067-1071.
- BUSTILLO, A. E. 2010. Parasitoides, predadores y entomopatógenos que afectan las plagas de la caña de azúcar en Colombia. *En*: Carta trimestral. Cenicaña Vol. 32 (3 y 4). (Jul-Dic). Edición digital.
- CAICEDO, A. M.; BELLOTTI, A. C. 1994. Evaluación del potencial del nematodo entomógeno *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología* Vol. 20 (4). p. 241-246.
- CAICEDO, A. M.; BELLOTI, A. 1996. Reconocimiento de nemátodos entomopatógenos nativos asociados con *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. Vol. 22. p. 19-24.
- CAICEDO, A. M.; TRUJILLO, H.; QUINTERO, M. P.; CALATAYUD, P. A.; BELLOTI, A. C. 2004. Reconocimiento de nemátodos entomopatógenos asociados a *Cyrtomenus bergi* en tres localidades de Colombia. Resúmenes del XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), Bogotá, D. C., p. 139.
- CANHILAL, R., REID, W., KUTUK, H., EL-BOUHSSINI, M., 2006. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Syrian soils. *Res. Journal Agric. Biol. Sci.* Vol. 2, 493–497.
- CARBALLO, M., FALGUMI, G. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Serie Técnica: Manual Técnico No. 53. Nicaragua. p. 232.
- CARDONA, C; J. W. MILES and SOTELO, G. 1999. An improved methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. Genotypes for resistance to *Aeneolamia varia* (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Economic Entomology*. Vol. 92 (2). p. 490-496.

CASTRO, U; GÓMEZ, L.A.; GUTIERREZ, Y; ANDRADE, L. P.; VILLEGAS, A y BERNAL, N. 2009. Distribución y especies de salivazo (Hemiptera: Cercopidae) asociados con la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el Valle del Cauca y Colombia. Tecnicaña - VIII Congreso de la Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar (Tecnicaña). Memorias, Cali, p. 144-151.

Cengicaña. 2007. Programa de manejo integrado de plagas. En: Eventos históricos y logros 1997-2007. Guatemala, p. 56-60. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/39476727/Eventos-Historicos-LogrosCG1992-2007>. Ultimo acceso 03/08/2011.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 2003a. Integrated Pest and disease management in major agroecosystems. Annual report. Soil Pest – Cassava and other crops, p. 53-70.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 2003b. Integrated Pest and disease management in major agroecosystems. Annual report. Soil Pest – Cassava and other crops, p. 1-42.

COBB, N.A., 1918. Estimating the nema population of the soil. Agricultural Technology Circular I, Bureau of Plant Industry, USDA. 1:1-48.

CONSTANT, P., MARCHAY, L., FISCHER-LE SAUX, M., BRIAND-PANOMA, S., MAULEON, H., 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe islands. Fundamental and Applied Nematology. Vol. 21(6). p. 667–672.

COOMANS, A. 2000. Nematode systematics: past, present and future. Nematology. Vol. 2 (1). p. 3-7.

CUI, L., GAUGLER, R., WANG, Y., 1993. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 62 (1). p. 73–78.

CUARÁN, V. L; CASTRO, V. U.; BUSTILLO, A. E.; MORENO, G. C.; MESA, N. C. 2011. Respuesta de variedades de caña de azúcar a ninfas *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). En: Resúmenes, Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 38. Manizales, Julio 27-29.

DE LEY, P. 2000. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. Nematology. Vol. 2(1). p. 9-6.

DE LEY, P. and BLAXTER, M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. *In*: The Biology of Nematodes. Lee, D.L. (ed.). Taylor and Francis, London. p. 1-30.

- DOUCET, M. M. A. DE; BERTOLOTTI, M. A.; CAGNOLO, S. R. DOUCET, M. E.; GIAYETTO, A. L. 2001. Consideraciones acerca de nematodos entomófagos (Mermithidae, Heterorhabditidae, Steinernematidae) de la Provincia de Córdoba. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. Vol. 66. p. 75-85.
- DOWNING, A. S., ERICKSON, S. G., KRAUS, M. J., 1991. Field evaluation of entomopathogenic nematodes against citrus root weevils (Coleoptera: Curculionidae) in Florida citrus. Florida Entomologist. Vol. 74. p. 584–586.
- DUNCAN, L. W., MCCOY, C. W., 1996. Vertical distribution in soil, persistence, and efficacy against citrus root weevil (Coleoptera: Curculionidae) of two species of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae). Environmental Entomology. Vol. 25 (1). p. 174–178.
- EIDT, D. C. and THURSTON, G. S. 1995. Physical Deterrents to Infection by Entomopathogenic Nematodes in Wireworms (Coleoptera: Elateridae) and Other Soil Insects. The Canadian Entomologist. Vol. 127(3). p. 423-429.
- ENKERLIN, D. and MORALES, J. A. 1979. The grass spittlebug complex *Aeneolamia albofasciata* and *Prosapia simulans* in northeastern Mexico and its possible control by resistant Buffelgrass hybrids. Miscellaneous Publication of the Texas Agricultural Experiment Station, 1451. p. 470-494.
- EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINERA, J. I. 1998. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Journal of Economic Entomology. Vol. 8(3). p. 821-825.
- EVANS, D. E. 1972. Studies on egg diapause in *Aeneolamia varia* saccharina Dist. (Homoptera: Cercopidae). London University. Trinidad, W. I. p. 186.
- FERRER, F; ARIAS, M; TRELLES, A; PALENCIA, G; NAVARRO, M. J, and COLMENAREZ, R. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 72 p.39-43.
- FEWKES, D. W. 1969. The biology of sugarcane froghoppers. In: J. R. Williams, J. R. Metcalfe, R.W. Mungomery and, R. Mathes. Pest of Sugar Cane. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. p. 283-307.
- FLORES, C.S. 1996. Mosca pinta o salivazo en caña de azúcar y pastos. En: Encuentro Regional Fitosanitario (Xalapa, Veracruz, México). Memoria Colegio de Ingenieros Agrónomos. p. 24-31.

- FRIEDMAN, M. J. 1990. Commercial Production and Development. En: Entomopathogenic nematodes in biological control. Gaugler R.; Kaya, H. K. Eds., Boca Raton, CRC Press, p. 153-172.
- GAUGLER, R.; LEBECK, L.; NAKAGAKI, B.; BOUSH, G. M. 1980. Orientation of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* to dioxide. *Environmental Entomology*. Vol 9 (5). p. 649-651.
- GAUGLER, R.; LEWIS, E. E and STUART, R. J. 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*. Vol.109. p.483–489.
- GAVIRIA, M. J. 2007. Dos insectos homópteros: una amenaza para la cañicultura en el Valle geográfico del río Cauca. *Tecnicaña. Capacitación Técnica para la Agroindustria*. Vol 11(19). p. 24-28.
- GAVIRIA, M. J y RODRÍGUEZ, CH. J. 2004. El salivazo o mión de los pastos en la cañicultura Colombiana. *Tecnicaña. Capacitación Técnica para la Agroindustria*. Vol 8 (15). p. 4-12.
- GEORGIS, R. and HAGUE, N. G. M. 1981. A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphiliidae). *Journal Annals of Applied Biology*. Vol. 99 (2). p. 171-177.
- GEORGIS, R.; HOM, A. 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into latin america and the caribbean. *Nematropica*. Vol. 22 (1). p. 81-98.
- GEORGIS, R., and MANWEILER, S.A. 1994. Entomopathogenic nematodes: a developing control technology. *Agricultural Zoology Reviews* (Evans, K. Ed). Vol. 6. p. 63-94.
- GEORGIS, R. 2002. biosys experiment: an insider's perspective. In: *Entomopathogenic nematology*. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). p. 357-371.
- GLAZER, I. 1996. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*. Vol 6 (3). p. 373-378.
- GLAZER, I and LEWIS, E. E. 2000. Bioassays for Entomopathogenic Nematodes. In: *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International 2000 (ed. Navon, A and Ascher, K. R.S). p. 229 - 247.
- GÓMEZ, L, L. A. 2007. Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el Valle del río Cauca. En: *Carta trimestral. Cenicaña*. Vol 29 (2 y 3). (abr-sep). p. 10-17.

GÓMEZ, L. L. A y GUTIÉRREZ, Y. 2009. *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) y la caña de azúcar: Estado actual, un año después de su detección. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña), documento de trabajo No. 697.

GREWAL, P. S., R. GAUGLER, y SELVAN, S. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes: Behavioral response to contact with host feces. *Journal of Chemical Ecology*. Vol.19(6). p.1219-1231.

GREWAL, P. S. 2002. Formulation and application technology. *In: Entomopathogenic nematology*. Gaugler, R. (Ed). CAB International, Walingford, U.K., p. 311-326.

GREWAL, P. S., KOPPENHOFER, A. M., CHOO, H. Y., 2005. Lawn, turfgrass and pasture applications. En: *Nematodes as Biocontrol Agents*. Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.). CAB International, New York, USA. p. 115–146.

GRIFFIN, C. T., CHAERANI, R., FALLON, D., REID, A. P., DOWNES, M. J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., and *Heterorhaditis indica* in Indonesia. *Journal Helminthology*. Vol. 74. p. 143–150.

GUIMARÃES, E. R.; MUTTON, M. A.; FERRO, M. I. T.; SILVA, J. A.; MUTTON, M. J. R.; KALAKI, D. B.; MADALENO, L. L. 2007. Evidence of sugarcane resistance against *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.* Vol. 26. p. 901-908.

GUTIÉRREZ, Y. y GÓMEZ, L. L. A. 2009. Algunas experiencias en el manejo del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en el Valle del Cauca. *Tecnicaña - VIII Congreso de la Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar*. p. 160-167.

HAGLEY, E. A. C.; BLACKMAN, J. A. 1966. Site of feeding of the sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Homoptera: Cercopidae). *Annals of the Entomological Society of America*. Vol.59. p. 1289-1291.

HAZIR, S., KESKIN, N., STOCK, S. P., KAYA, H. K., OZCAN, S. 2003. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (*Rhabditida: Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in Turkey. *Biodiversity and Conservation*. Vol.12 (2). p. 375-386.

HOLMANN, F. 2008. Impacto económico de los salivazos en pastos en: Insectos que ponen en riesgo los pastos del Valle del Cauca: salivazo o mión. En: *Insectos que Ponen en Riesgo los Pastos del Valle del Cauca: Salivazo o Mion*. Disponible en www.cenicana.org/pdf/no_clasificacion/6195.pdf. Ultimo acceso 10/05/2011.

- HOMINICK, W. H.; COLLINS, S. A. 1997. Application of ecological information for practical use of insect pathogenic nematodes. Capítulo 2. *In: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity. Symposium proceedings No. 68. Farham (Inglaterra) British Crop Protection Council. p. 302.*
- HOMINICK, W. M., 2002. Biogeography. *In: Entomopathogenic nematology. Gaugler, R. (Ed). CAB International. p. 115–143.*
- ISHIBASHI, N.; KONDO, E. 1990. Behavior of infective juveniles. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control. Gaugler R.; Kaya, H. K., (Eds). Boca Raton, CRC Press, p. 139-150.*
- JACKSON, J.J. y BROOKS, M.A. 1995. Parasitism of western corn rootworm larvae and pupae by *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology. Vol. 27 (1). p. 15-20.*
- KAYA, H. K. 1985. Susceptibility of early larval stages of *Pseudalletia unipuncia* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 46 (1). p. 58-62.*
- KAYA, H. K. 1990. Soil ecology. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control. Gaugler R.; Kaya, H. K. (Eds). Boca Raton (USA), CRC Press, p. 93-115.*
- KAYA, H. K. 1993. Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes. Food and fertilizer technology center, Taipei City, Taiwan, Extensión Bulletin No. 375, p. 1-13.
- KAYA, H. K.; KOPPENHÖFER, A. M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology, Vol. 6. p. 357-371.*
- KAYA, H. K.; STOCK, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. En: Manual of techniques in insect pathology. Lawrence Lacey. Eds. Academic Press, Inc. San Diego. Chapter, 6. p. 281-324.
- KAYA, H. K.; KOPPENHÖFER, A. M. 1999. Biology and ecology of insecticida nematodes. *In: Optima use of insecticida nematodes in pest management. Polavarapu (Ed.). New Brunswick, New Jersey: Rutgers University. p. 1-8.*
- KOPPENHÖFER, A. M. and KAYA, H. K. 1995. Density-Dependent Effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an Insect Host. *Journal of Parasitology. Vol. 81 (5). p. 797-799.*

KOPPENHÖFER, A. M.; BAUR, M.; STOCK, P. S.; CHOO, H. Y.; CHINNASRI, B.; KAYA, H. K. 1997. Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. *Applied Soil Ecology*. Vol. 6. p. 231-240.

KOPPENHÖFER, A. M.; CHOO, H. Y.; KAYA, H. K., LEE, D. W. and GELERTER, W. D. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological control* 14, 37-44.

KOPPENHÖFER, A. M. and FUZY, E. M. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. Vol. 97(6). p. 1842-1849.

LASTRA, B. L.A. y GÓMEZ, L. A. 2000. Las plagas de la caña de azúcar: su manejo y control. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicafá). Documento de trabajo No. 533. p. 12.

LECUONA, R.E. ed. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. Talleres gráficos Mariano. p. 338.

LEITE, L. G., MACHADO, L. A., AGUILLERA, M. M., RODRIGUES, R. C. D. y NEGRISOLI A. S. Jr. 2002. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista de agricultura*. Vol. 78: 139-148.

LEITE, L.G., MACHADO, L.A., GOULART, R. M; TAVARES, F.M and BATISTA-FILHO, A. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*. Vol.34. p. 785-790.

LEWIS, E. E and GAUGLER, R. 1994. Entomopathogenic Nematode (Rhabdita' Steinernematidae) Sex Ratio Relates to Foraging Strategy. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 64. p. 238-242.

LEZAMA, G. R., HAMM, J. J., MOLINA, O. J., LOPEZ, E. M., PESCADOR, R. A., GONZALEZ, R. M., STYER, E., 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacan, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*. Vol. 84 (1). p. 23-30.

LINARES, B. y SALAZAR, J. 2007. Candelilla; salivazo de la caña de azúcar *Aeneolamia varia* (Fabricios). Disponible en [www. Plagas-agricolas.info.ve/fichas/ficha](http://www.Plagas-agricolas.info.ve/fichas/ficha). Último acceso 11/04/2011.

LÓPEZ, N., J. C. 2002. Nematodos parásitos de insectos y su papel en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). In: Memorias Curso Internacional Teórico –Práctico. Sección II. Parasitoides y otros enemigos de la broca. Cenicafé, Chinchiná, Colombia, Marzo 18-22, p. 39–70.

LÓPEZ N., J. C. 2005. ¿Es posible el uso de entomonematodos en programas MIP en Colombia? : Avances con la broca del café. XXXII Congreso Sociedad Colombiana de entomología (SOCOLEN), Ibagué. p. 33-39.

LÓPEZ N., J. C.; CANO, L.; GÓNGORA, C. E.; STOCK, S. P. 2007. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology*. Vol. 9 (3). p. 333 - 341.

LÓPEZ, N. J. C. 2008. Nematodos para el control de insectos plagas. Capítulo 10, p. 150 - 183. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC – Cenicafé, Chinchiná (Colombia). Manizales. (Ed. Bustillo, P. A.). p. 466.

LÓPEZ N., J. C.; PLICHTA, K.; GÓNGORA, C. E.; STOCK, P. 2008. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) from Colombia. *Nematology*. Vol. 10 (4). p. 561 – 574.

MASON, J. M., RAZAK, A. R., WRIGHT, D. J., 1996. The recovery of entomopathogenic nematodes from selected areas within Peninsular Malaysia. *Journal Helminthology*. Vol. 70. p. 303–307.

MELO, E. L.; ORTEGA, C. A.; GAIGL, A.; BELLOTTI, A. C.; EHLERS, R. U.; SUSURLUK, 2004. Búsqueda de poblaciones nativas de nemátodos entomopatógenos en regiones de Colombia y Panamá. Resúmenes del XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), Bogotá, D. C., p. 139.

MELO, E. L., ORTEGA, C A.; SUSURLUK, A.; GAIGL, A.; EHLERS, R. U. 2006. Búsqueda de nematodos entomoparásitos asociados a insectos rizófagos en regiones de Colombia y Panamá. p. 28-32. In: Nematodos entomoparásitos: experiencias y perspectivas. Parada, J. C.; Luque, J. E.; Piedrahita C, W. de J. (Eds). Universidad Nacional de Colombia. p.193.

MENDOÇA, A. F. 2001. Manejo integrado del salivazo de la raíz de la caña de azúcar. *Mahanarva fimbriolata* en Brasil. Memorias del I Taller Latino Americano sobre Plagas de la Caña de Azúcar. Guayaquil, nov.28-30. AETA-Atalac. p 48-55.

MENDONÇA, A. F.; FLOREZ, S.; SAÉNZ, C. E. 2005. Cigarrinhas da-cana-de-açúcar na América Latina e Caribe. p. 51-94. En: Cigarrinhas da-cana-de-açúcar. Controle biológico. Mendonça, A.F (ed.). Insecta. Maceió, Brasil. p. 317.

MENDOZA, J. R. 2001. Bioecología del salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena* (Hom: Cercopidae) en el Ecuador. Memorias del I Taller Latino Americano sobre Plagas de la Caña de Azúcar. Guayaquil, nov.28-30. AETA-Atalac. p 40-47.

MIDITURI, J. S., WAEYENBERGE, L., MOENS, M., 1997. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Belgian soils. Russ. Journal Nematology. Vol. 5. p. 55–65.

MONTEPEQUE, R. R. 2005. Manejo integrado de plagas en caña de azúcar en Guatemala. Revista Asociación de Técnicos azucareros de Guatemala (Atagaua). Guatemala - Guatemala. p. 17-18.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. 2002. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III – Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. En: 8 Congresso nacional da STAB, Recife. p. 452-457.

NILAKHE, S. S. 1985. Ecological observations on spittlebugs with emphasis on their occurrence in rice. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasilia, 20. p. 407-414.

OBANDO, B. J.; BUSTILLO, A. E.; CASTRO, V. U.; RAMIREZ, G. D.; MORENO, G. C.; MESA, N. C 2011. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para el control de *Aeneolamia varia* (F.) (Homoptera: Cercopidae). En: Resúmenes, Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 38. Manizales, Julio 27-29.

PARADA, J. C. 2006. Steinernematidae en Cundinamarca y sur de Boyacá, Colombia. *In*: Nematodos entomoparásitos: experiencias y perspectivas. Parada, J. C.; Luque, J. E.; Piedrahita C, W. de J. Eds. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Agronomía, p.10-27.

PATEL, M. N.; PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. 1997. Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae). International Journal for Parasitology. Vol. 27 (1). p. 61-70.

PECK, D.C. 1998. Natural history of the spittlebug *Prosapia* nr. *bicincta* (Homoptera: Cercopidae) in association with dairy pastures of Costa Rica. Annals of the Entomological Society of America. Vol. 91. p. 435-444.

PECK, D.C. 2001. Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homoptera: Cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología. Vol. 27(3- 4), p. 129-136.

PECK, D. C; CASTRO, U.; LÓPEZ, E; MORALES, A; RODRÍGUEZ, J. 2001. First records of the sugarcane and forage grass pest *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South América. Florida Entomologist. Vol. 84 (3). p. 402-409.

PECK, D. C.; PÉREZ, A. M; MEDINA, J. W. 2002. Biología y hábitos de *Aeneolamia reducta* y *A. lepidior* en la Costa Caribe de Colombia. *Pasturas Tropicales*. Vol. 24(1). p.16-25.

PECK, D. C.; RODRÍGUEZ, J y GÓMEZ, L. A. 2004. Identity and first record of the spittlebug *Mahanarva bipars* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopidae) on sugarcane in Colombia. *Florida Entomologist*. Vol. 82 (1). p. 82-84.

PETERS, A. y EHLERS, R.U. 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* y *Tipula oleraceae*; Tipula: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 63. p.163-171.

POINAR, G. O. Jr. 1976. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). *Nematologica*. Vol. 21. p. 463-470.

POINAR, G. O, Jr, LINARES, B. 1985. *Hexamermis dactylocerus* sp.n. (Mermithidae: Nematoda) a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homoptera) in Venezuela. *Revue de Nematologie*. Vol. 8. p. 109-111.

PORTILLO, A. C.; VILLANI, M. G.; TAUBER, J. M.; TAUBER, A. C.; NYROP, P. J. 1999. Entomopathogenic Nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) Response to Soil Texture and Bulk Density. *Environmental Entomology*. Vol. 28 (6). p. 1021-1035.

POSADA, L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. ICA, Cuarta edición. Bogotá, Boletín Técnico. No 43. p. 663.

QUINTERO, J .C.; LÓPEZ, N. J. C.; ARISTIZABAL, A. L. F. 2007. Susceptibilidad del salivazo de los pastos *Aeneolamia* sp. a nematodos entomopatogenos nativos. Manizales, Colombia. Universidad de Caldas. Fitotecnia No. 125. p. 2.

RASMANN, S.; KÖLLNER, G. T.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J y TURLINGS, T. C. J .2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. Ted C. J. Turlings. *Nature* 434, 732-737.

RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; ROSSINI, M. M. 2006. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. *Food Science and Technology. Scientia Agricola*. (Piracicaba, Brazil). Vol .63 (6). p. 534-539.

REALPE, A. F.J.; BUSTILLO, P. A. E.; LÓPEZ, N. J. C. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L) para la producción de nematodos entomopatogenos parásitos de la broca de Café. *Cenicafe*. Vol. 58 (2). p. 142-157.

RODRÍGUEZ CH., J. y PECK, D. C. 2007. Biología y hábitos de *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae) en condiciones de casa de malla. Revista Colombiana de Entomología. Vol. 33 (1), p. 31-35.

ROSA, J. S., BONIFAASSI, E., AAMARL, J., LACEY, L. A., SIMOES, N., LAUMOND, C., 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. Journal Nematology. Vol. 32 (2). p. 215–222.

ROVESTI, L and DESEO, K. V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (nematoda: steinernematidae). Nematologica, 36 (9). p. 237-245.

SÀENZ, A. 1998. *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae) ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá, p.125.

SALAZAR, J y PROAÑO, L. 1989. Pérdidas ocasionadas por la candelilla de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*) en el área de influencia del central Río Turbio: Estudio comparativo de las zafras 84/85 y 85/86. Caña de azúcar. Vol. 7(2). p 49-54.

SENDOYA, C. A.; RAMIREZ, G. D.; BUSTILLO, A. E.; CASTRO, U. 2011. Biología de *Aeneolamia varia* (F) (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar en el Valle del Cauca. En: Resúmenes, Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 38. Manizales, Julio 27-29.

SOUZA, A. R. and S. S. NILAKE. 1985. Damage evaluation and chemical control of spittlebugs in rice crop. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil. 14. p.177-188.

SCHNEIDER-ORELLI, O., 1947. Entomologisches Praktikum. In: Sauerlander, H.R. (Ed.), Aarau. Switzerland. Disponible en: <http://www.ehabsoft.com/ldpline/HschneiOrli.htm>. Último acceso 02/08/11.

STEHR, F. W. 1987. Immature Insects. Stehr, F.W. (Ed) Publisher: Kendall/Hunt. Vol.1. p.754.

STOCK, S. P. 1998. Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe (Argentina). p.106.

STOCK, S. P., PRYOR, B. M., KAYA, H. K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodiversity and Conservation. Vol. 8 (4). p. 535–549.

STOCK, S. P., AL BANNA, L., DARWISH, R., KATBEH, A. 2008. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (*Nematoda*: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*) and their bacterial symbionts (γ -Proteobacteria: *Enterobacteriaceae*) in Jordan. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 98 (2). p. 228-234.

TANADA, Y and KAYA, H. K. 1993. Nematodes, nematomorphs, and plathelminthes. *In*: *Insect pathology*. Chapter 13. San Diego, USA, Academic Press, p.666.

TANGCHITSOMKID, N., SONTIRAT, S., 1998. Occurrence of entomopathogenic nematodes in Thailand. *Kasetsart Journal of Natural Sciences*. Vol.32. p. 347–354.

VICTORA J. I.; VIVEROS C. A.; CASSALETT C.; CALDERON H. 1997. Establecimiento de Semilleros Limpios. Cali, CENICAÑA. p. 20.

WEISS, M. R. 2006. Defecation Behavior and Ecology of Insects. *Annual Review of Entomology*. Vol. 51. p. 635-661.

WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

WOUTS, W. M. 1991. *Steinernema (Neoaplectana)* and *Heterorhabditis* species. *In*: *Manual of agricultural nematology*. Nickle, W. R. (ed.). New York. Marcel Dekker. p. 855-897.