



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Control del picudo de la guayaba  
*Conotrachelus psidii* Marshall  
(Coleoptera: Curculionidae) con  
nematodos entomopatógenos.**

**Clara Yalexty Delgado Ochica**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Bogotá D.C., Colombia

2012



# **Control del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) con nematodos entomopatógenos.**

**Clara Yalexty Delgado Ochica**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias- Entomología**

Directora:

MSc. Adriana Sáenz Aponte

Codirector:

MSc. Augusto Ramírez Godoy

Línea de Investigación:

Control Biológico

Grupo de Investigación:

UNESIS - Pontificia Universidad Javeriana.

Bogotá D.C., Colombia

2012

*Vale más un lápiz corto que una memoria larga.*

*Michel Alberico.*

## Agradecimientos

A Dios;

A mi familia por el apoyo, la confianza y su comprensión todos estos años;

A la Pontificia Universidad Javeriana por el apoyo económico y logístico del proyecto de investigación;

A mi directora Adriana Sáenz por su amistad, confianza, orientación y formación, por sus valiosos consejos y su constante paciencia;

Al Dr. Álvaro Hernández por su amor hacia su tierra, por luchar por sus ideales y por la ayuda en este proyecto.

A Rosalva Velasco y Germán Rueda por su disponibilidad, amistad y apoyo en las fases de campo;

Al profesor Giovanny Fagua por su apoyo en todos los aspectos de mi vida;

A Héctor Duarte por su amor, amistad, comprensión y apoyo incansable, por las desveladas, trasnochadas y fines de semana en el laboratorio;

A Daniel Chiriví y Paola Correa por su amistad y colaboración incondicional;

A Johan Solano por su impulso y consejos en el momento adecuado;

A todos los que de alguna forma ayudaron y apoyaron este proyecto: Gracias, aunque unas breves líneas no pueden dar cuenta de mi profunda gratitud y de los recuerdos imborrables que guardo.



## Resumen

El picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* es una de las principales plagas del cultivo de la guayaba en la provincia de Vélez-Colombia, causa pérdidas severas en la calidad y cantidad de los frutos. El control biológico aparece como una opción viable para el manejo de la plaga y en especial, los nematodos entomopatógenos-NEPs han mostrado buenos resultados (63-90% mortalidad) para el control de larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba. En el presente trabajo se evaluó la eficacia de nematodos entomopatógenos sobre larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba en condiciones de laboratorio, invernadero y campo. Se evaluó el efecto de siete especies de nematodos: *Steinernema websteri* JCL006, *Steinernema* sp.1 JCL024, *Steinernema* sp.2 JCL007, *Steinernema* sp.3 JCL027, *S. colombiense* SNI0198, *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 y *Heterorhabditis* sp. SL0708. En condiciones de la boratorio se registró una mortalidad para *Heterorhabditis* sp. SL0708 del 85%, para *Steinernema* sp.1 JCL024 del 75% y para *S. colombiense* SNI0198 del 55%, las otras especies de NEPs presentaron mortalidad menor al 25%. En invernadero se evaluó la eficacia de *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 mediante cadáveres infectados, donde el tratamiento de *Heterorhabditis* sp. SL0708 presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con el control; ésta especie de NEP fue seleccionada para los ensayos de campo. En las parcelas en campo, *Heterorhabditis* sp. SL0708 genera los mayores porcentajes de mortalidad con la aplicación de 4 y 6 cadáveres infectados, 21 días después de la aplicación. *Heterorhabditis* sp. SL0708 a partir de cadáveres infectados se desplaza en los primeros 20 cm de la superficie del suelo a una distancia de 120 cm, en un tiempo de 3 semanas principalmente.

**Palabras clave:** Control biológico, *Steinernema* sp., *Heterorhabditis* sp., Juvenil infectivo, guayaba.

## Abstract

Guava weevil *Conotrachelus psidii* is a main insect pest of guava crop in Vélez province-Colombia, causing severe losses in fruit quality and quantity. Biological control appears as an option for pest management and in particular, entomopathogenic nematodes (EPN) have demonstrated high pathogenicity (63-90%) for the control of fourth instar larvae of the guava weevil. Was evaluated the virulence of entomopathogenic nematodes on fourth instar of weevil larvae in laboratory, greenhouse and field, comparing the susceptibility to seven EPN species: *Steinernema websteri* JCL006, *Steinernema* sp.1 JCL024, *Steinernema* sp.2 JCL007, *Steinernema* sp.3 JCL027, *S. colombiense* SNI0198, *Heterorhabditis bacteriofora* HNI0100 and *Heterorhabditis* sp. SL0708. In laboratory *Heterorhabditis* sp. SL0708 mortality was 85%, *Steinernema* sp.1 JCL024 75% and *S. colombiense* SNI0198 55%, the other NEPs species mortality was less than 25%. In greenhouse experiments *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 efficacy was evaluated from insect cadavers, the first one presented significant differences ( $P < 0.05$ ) with the control. *Heterorhabditis* sp. SL0708 was selected for field experiments, its mortality in field was biggest in the last evaluation (21 days after application).

**Keywords:** Biological control, *Steinernema* sp., *Heterorhabditis* sp., Infective juvenile.



# Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Lista de figuras .....	XI
Lista de tablas .....	XIII
Introducción .....	15
<b>1. Planteamiento del problema y justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo general .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3. Marco teórico .....</b>	<b>20</b>
3.1 Sitio de estudio.....	20
3.2 El cultivo de guayaba .....	20
3.2.1 Mercadeo y oportunidades .....	21
3.2.2 Aspectos agroecológicos.....	22
3.3 El picudo de la guayaba <i>Conotrachelus psidii</i> Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) .....	23
3.4 Control del picudo de la guayaba .....	25
3.4.1 Nematodos entomopatógenos.....	26
3.4.2 Control del picudo con nematodos entomopatógenos .....	28
<b>4. Marco metodológico .....</b>	<b>31</b>
4.1 Localización .....	31
4.2 Material biológico .....	31
Picudo de la guayaba <i>Conotrachelus psidii</i> (Coleoptera: Curculionidae) .....	31
Cría de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	32
Producción de nematodos entomopatógenos.....	32
4.3 Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio.....	32
4.3.1 Ensayo de columnas de arena.....	35
4.4 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.....	36
4.5 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.....	37
4.5.1 Dispersión de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo.....	38
4.5.2 Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo.....	39

---

4.6	Análisis estadístico.....	39
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
5.1	Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio .....	41
5.1.1	Ensayo de columnas de arena. ....	43
5.2	Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.....	44
5.3	Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.....	46
5.3.1	Dispersión de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo. ....	47
5.3.2	Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo. ....	52
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>53</b>
6.1	Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio .....	53
6.1.1	Ensayo de columnas de arena. ....	55
6.2	Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.....	56
6.3	Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.....	58
6.3.1	Dispersión de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo. ....	59
6.3.2	Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo. ....	60
<b>7.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>64</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 3-1:</b> Fruto de guayaba ( <i>P. guajava</i> ) de 40 días. A. Daño externo generado por la hembra del picudo de la guayaba ( <i>C. psidii</i> ) al ovipositar en los frutos y la maduración prematura del mismo. B. Daño interno del fruto (petrificación) generado por larvas del picudo.	25
<b>Figura 4-1:</b> Diagrama del montaje de la columna de arena. Tubo de PVC de 10 cm de alto por 5 cm de diámetro y en el fondo una larva del hospedero cubierto con angeo. ....	36
<b>Figura 4-2:</b> Esquema de una parcela evaluada en cada muestreo; las muestras fueron tomadas en diferentes distancias y profundidades del lugar de aplicación de los cadáveres infectados de <i>G. mellonella</i> con <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708. Los puntos de colecta fueron cambiados en cada fecha de muestreo. ....	38
<b>Figura 5-1:</b> Promedio del porcentaje de mortalidad ( $\pm$ ES) de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba ( <i>C. psidii</i> ) causada por la exposición a 100JI / larva de siete especies de nematodos entomopatógenos evaluados. H1: <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708; S1: <i>Steinernema</i> sp.1 JCL024; Sc: <i>Steinernema colombiense</i> SNI0198; S3: <i>Steinernema</i> sp.3 JCL027; Hb: <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HNI0100; Sw: <i>Steinernema websteri</i> JCL006; S2: <i>Steinernema</i> sp.2 JCL007. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). ....	42
<b>Figura 5-2:</b> Producción promedio de JI ( $\pm$ DE) de tres especies de nematodos entomopatógenos por larva de cuarto instar del picudo de la guayaba <i>C. psidii</i> . Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$ ). ....	43
<b>Figura 5-3:</b> Promedio del porcentaje de mortalidad de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba ( <i>C. psidii</i> ) y de larvas de último instar de <i>G. mellonella</i> causada por <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 y <i>Steinernema</i> sp.1 JCL024 en dosis de 200 JI y 500 JI en las columnas de arena. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). ....	44
<b>Figura 5-4:</b> Promedio porcentaje de mortalidad ( $\pm$ ES) de larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba ( <i>C. psidii</i> ) causada por <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 y <i>Steinernema</i> sp.1 JCL024 en cinco dosis de cadáveres de <i>G. mellonella</i> (0, 1, 2, 4 y 6 cadáveres) en condiciones de invernadero. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$ ). ....	45
<b>Figura 5-10:</b> Promedio del porcentaje de mortalidad corregido (Abbott) de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba ( <i>C. psidii</i> ) causada por 0, 2, 4 o 6 cadáveres infectados con <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 en campo, a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ).	47

---

<b>Figura 5-5:</b> Promedio del JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes distancias del punto donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres ( $\pm$ DE). Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). .....	48
<b>Figura 5-6:</b> Promedio de JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres ( $\pm$ DE). Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). .....	49
<b>Figura 5-7:</b> Promedio del número de JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 ( $\pm$ DE) recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes fechas de muestreo donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). .....	50
<b>Figura 5-8:</b> Distribución espacial y temporal del número total de JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicó 1 cadáver.....	51
<b>Figura 5-9:</b> Distribución espacial y temporal del número total de JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicaron 15 cadáveres.....	51
<b>Figura 5-11:</b> Promedio del porcentaje de mortalidad de las larvas de último instar del <i>G. mellonella</i> causada por 0, 2, 4 o 6 cadáveres infectados con <i>Heterorhabditis</i> sp. SL0708 en campo, a los 2, 4, 6, 8,10 y 12 semanas después de la aplicación. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet, $P \leq 0.05$ ). .....	52

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 4-1:</b> Nematodos entomopatógenos a evaluados para el control del picudo de la guayaba <i>C. psidii</i> . De la 1 a la 6 especies entregadas a la Pontificia Universidad Javeriana por Cenicafé con el convenio No. 182 de 2009. La 7 obtenida por la universidad.....	33



## Introducción

El picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) es la principal plaga del cultivo de la guayaba en la región de Santander-Colombia, el cual ha ocasionado pérdidas hasta el 80% de la producción desde el 2007 (Com. Personal. Hernández y Pinzón 2011). El daño es realizado por las larvas que se alimentan de las semillas y la pulpa, produciendo un ennegrecimiento y endurecimiento de la parte afectada. Las excretas de la larva en el interior de la guayaba ocasionan petrificación del fruto, maduración prematura y caída del mismo (Insuasty *et al.* 2007), haciendo al fruto inservible para cualquier forma de utilización.

El control del picudo en Santander es muy escaso y difícil dado que los guayabales se encuentran silvestres ó asociados a sistemas silvopastoriles, por lo que ésta plaga está generando pérdidas económicas significativas, aumentando en cada cosecha. Debido a las pérdidas que se generan, se buscan estrategias económicamente viables para el sistema agrícola de la región y ecológicamente autosostenibles para el control del picudo, que puedan ser incorporados a una estrategia de Manejo Integrado de Plagas (MIP) como el control biológico, el control cultural, el uso de feromonas, el desarrollo de plantas resistentes, entre otras alternativas (Federici 1999).

Como parte fundamental del control biológico se destacan los patógenos, ya que por lo general matan a su huésped, multiplicándose adaptándose al medio y estableciéndose en algunos casos. Los microorganismos patógenos para insectos surgen naturalmente y pueden perpetuarse por sí mismos en prácticamente todos los cultivos agrícolas sin producir detrimento en el medio. Hasta hoy no hay pruebas de que los insectos hayan desarrollado resistencia a los insecticidas microbiales, pero en costo y velocidad de acción la mayoría de éstos insecticidas no pueden competir con los insecticidas químicos (Federici 1999).

Entre los insecticidas microbiales se encuentran los nematodos entomopatógenos (NEPs) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Rhabditida), los cuales son

parásitos obligados de insectos. Están asociados mutualísticamente con bacterias que generan septicemia y otras afecciones letales en el huésped. El ciclo de vida del nematodo tiene diferentes etapas de las cuales el Juvenil Infectivo (JI) es de vida libre que parasita al hospedero. La asociación nematodo-bacteria es la que determina la efectividad y selectividad de estos controladores, razón por la cual se realizan gran variedad de ensayos en laboratorio para establecer la patogenicidad y virulencia de las especies de nematodos entomopatógenos para el control de un determinado organismo (Dolinski 2009, Grewal *et al.* 2005).

Los nematodos son muy sensibles a las condiciones ambientales como la humedad (disección), lo que limita su éxito en los programas de manejo. Los NEPs son más eficientes en condiciones del suelo ó en habitas crípticos donde encuentran protección a las condiciones ambientales extremas (Kaya y Gaugler 1993). Estos nematodos son potenciales agentes para el control del picudo de la guayaba dado que varios de sus estadíos ocurren en o sobre el suelo (cuarto instar larval, pupa y parte del adulto), lo que podría desencadenar una estrategia racional para combatir esta plaga, como se ha demostrado en varios estudios desarrollados por Del Valle *et al.* (2005, 2008) y Dolinski *et al.* (2007), quienes han reportado porcentajes de control elevados.

Teniendo en cuenta la importancia del cultivo, los problemas para el control del picudo de la guayaba y la posibilidad de los nematodos entomopatógenos para controlar al picudo de la guayaba, se evaluó la eficacia de los nematodos entomopatógenos disponibles en Colombia, sobre larvas de cuarto instar del picudo bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo.



1.

## 2. Planteamiento del problema y justificación.

El cultivo de guayaba en Colombia se conoce como cultivo de potrero, barranco, de camino o de patio casero, en la cual no se aplican tecnologías en el 90% de los casos. En el país hay sembradas 79423 ha de guayaba entre árboles en sistema disperso, mixto, solo e intercalado, donde el departamento de Santander aporta el 34% (Insuasty *et al.* 2011). La mano de obra ocupada en la recolección y empaque de la guayaba en Colombia se estima en 1'140000 jornales/año, donde participan más de 9000 familias y generan una producción cuyo valor anual se puede estimar entre U\$14 a U\$20 millones (Perales *et al.* 2005, Insuasty *et al.* 2011).

El picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) es la principal plaga del cultivo en la región de Santander, el cual ha venido ocasionando pérdidas de hasta el 80% de la producción desde el 2007 (Com. Personal. Hernández y Pinzón 2011), donde el daño que ocasionan las larvas hace al fruto inservible para cualquier forma de utilización ó consumo animal o humano (Insuasty *et al.* 2007). Actualmente esta plaga parece estar fuera de control en el área guayabera Santandereana dado que es una plaga exógena que no posee enemigos naturales que ejerzan un control en sus poblaciones; adicionalmente el trabajo que se realiza en el manejo de ésta plaga es muy poco o nulo.

Entre las investigaciones realizadas sobre el conocimiento del picudo de la guayaba, presentes en los cultivos en Suramérica, se destacan los trabajos de Monrroy e Insuasty (2006) en el que describen su ciclo de vida en Barbosa-Santander; Boscán y Cásares (1980) quienes evaluaron los daños del picudo en Venezuela y en 1981, determinaron las épocas del año en que se encuentran las diferentes fases del insecto en el campo. Brito *et al.* (2008) probaron la aplicación de aceites vegetales, imidaclopril con hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*). Del Valle *et al.* (2005,

2008) y Dolinski *et al.* (2007), evaluaron la eficacia de los nematodos entomopatógenos sobre el picudo bajo laboratorio, invernadero y campo en Brasil, con porcentajes de mortalidad entre 70-95%. Aunque se ha demostrado la alta eficacia de nematodos entomopatógenos para el control del cuarto instar larval del picudo por encontrarse en el suelo, este tipo de estudios no se han realizado en el país, ni se han evaluado las especies de nematodos entomopatógenos disponibles en Colombia para el control de ésta plaga.

El control biológico es una herramienta que está siendo utilizada para el manejo de organismos plagas como una opción de bajo impacto ambiental (Alomar y Albajes 2005, Nichols-Estrada 2008, Grewal *et al.* 2005). En el grupo de entomopatógenos, los nematodos han sido de gran interés por reproducirse en el insecto-plaga produciendo nuevas generaciones que van a infectar nuevos individuos huésped, matan rápidamente a su hospedero, tienen un tercer estadio ó Juvenil Infeccioso (JI) que no se alimenta, está adaptado a sobrevivir en el suelo dependen de sus reservas hasta encontrar a su huésped, además tienen la capacidad para buscar activamente a su hospedero. Por otra parte, tienen desventajas como amplio rango de hospederos, limitada tolerancia a condiciones ambientales, tiempo corto de almacenamiento, pobre persistencia en campo y altos costos en comparación con los pesticidas químicos (Grewal *et al.* 2005, Kaya y Gaugler 1993, Merino y France 2009).

La atención de los investigadores se ha centrado especialmente en los nematodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Grewal *et al.* 2005), donde cada especie es específica ó puede infectar un pequeño número de especies (no se han registrado efectos negativos en huéspedes no blanco). En el presente estudio se realizará la aplicación de NEPs mediante la técnica del de cadáveres de insectos infectados, la cual ha demostrado una mayor dispersión en el suelo, mayor infectividad y supervivencia de los JIs en comparación con la suspensión acuosa (Shapiro- Ilan *et al.* 2003).

A partir de la importancia del cultivo, los problemas para el control del picudo de la guayaba y las características de los nematodos entomopatógenos, se evaluó la virulencia de especies de nematodos entomopatógenos sobre larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo, y su persistencia en el suelo; para generar una propuesta de control biológico para el manejo con del picudo de la guayaba.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de los nematodos entomopatógenos colombianos para el control de larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

### 3.2 Objetivos específicos

Evaluar la virulencia de siete especies de nematodos entomopatógenos aislados en suelos colombianos contra larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba en pruebas de laboratorio e invernadero.

Establecer la eficacia de los JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 aplicados mediante la técnica del cadáveres infectados contra las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba en campo.

Determinar el patrón espacio-temporal y la persistencia en el suelo de los juveniles infectivos de *Heterorhabditis* sp. SL0708 cuando se aplican como cadáveres infectados bajo condiciones de campo.

## 4. Marco teórico

### 4.1 Sitio de estudio

Los ensayos de campo se realizaron en el municipio de Guavatá - Santander. La cabecera dista a 177 Km de Bogotá D.C. Pertenece a la provincia de Vélez, zona que constituye la principal región agroindustrial de guayaba y de bocadillo en Colombia. Hidrográficamente el municipio se localiza sobre la cuenca del río Suárez, con un período seco entre diciembre a marzo y un “veranillo” entre julio y agosto. La humedad relativa en promedio es del 78%. Las condiciones del suelo en Guavatá son PH ácido (5.8 – 5.1) y sobre la clase textural el suelo es principalmente franco-arcilloso, con contenido de materia orgánica y nitrógeno alto (Anónimo 2012, Morales y Melgarejo 2010).

### 4.2 El cultivo de guayaba

*Psidium guajava* Linneo (1753) (Rosales: Myrtaceae) conocida como guayaba, es nativa de los trópicos de América, pero hoy se encuentra en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo dentro de los 35° latitud norte y 35° latitud sur (Raga *et al.* 2006). La guayaba es una fruta de aroma fuerte inconfundible, sabor exquisito, considerada la reina de las frutas además por su contenido de minerales, vitaminas, principalmente vitamina C (10 veces más que la naranja), también contiene aminoácidos como lisina y triptófano tan importantes en la alimentación de los niños en los primeros cinco años de vida para el desarrollo normal del cerebro (Lozano *et al.* 2002, Perales *et al.* 2005).

En general, la guayaba muestra mucha diversidad en tamaño de la fruta, forma, cantidad de semilla, tamaño y dureza de la misma, sabor de la pulpa, textura, color, aroma, contenido de ácido ascórbico, acidez; susceptibilidad a plagas y enfermedades, a cuarteamiento del fruto; rendimiento, hábito de crecimiento, vigor, tiempo de floración entre cosecha y vida de estante del fruto (Lozano *et al.* 2002).

En Colombia se puede encontrar silvestre, cultivada sin ningún cuidado y en cultivos a gran escala. La principal región agroindustrial de la guayaba y de bocadillo en el país es la provincia de Vélez (Santander), allí los guayabales son principalmente silvestres o se encuentran asociados a sistemas silvopastoriles; bajo estas condiciones naturales, la guayaba inicia brotes al principio del periodo lluvioso y las hojas maduras son sustituidas por brotes nuevos, por lo cual la producción y cosecha es periódica (Morales y Melgarejo 2010).

En la provincia de Vélez se presentan dos cosechas en el año, una en la primera mitad del año llamada “cosecha de mitaca” ó pequeña producción. La segunda producción al final del año conocida como cosecha principal. Sin embargo, se han registrado alteraciones en el ciclo de producción debido posiblemente a factores climáticos como altas precipitaciones (ausencia de veranillo) (Lozano *et al.* 2002).

#### **4.2.1 Mercadeo y oportunidades**

*P. guajava* es un cultivo importante en una gran cantidad de países de las zonas tropicales. Entre los principales países productores están India, Pakistan, México y Hawaii; Venezuela y Brasil en su mayoría la industrializan y derivan sub-productos para la exportación (Cordero *et al.* 2003). En Colombia la guayaba se encuentra en sistema silvopastoril ó rumiante, esta situación es propicia en la actualidad cuando el mundo demanda productos limpios y libres de agroquímicos principalmente (Lozano *et al.* 2002).

La mayor producción de guayaba en Colombia se encuentra en el Departamento de Santander con 51176 toneladas (34%) de las 145665 toneladas a nivel nacional, seguido por Boyacá (20%), y Tolima (12.3%). Los productores a nivel regional corresponden a una población rural en un 99% de economía campesina, con un sistema de explotación agropastoril (Insuasty *et al.* 2011).

La principal agroindustria rural derivada de esta fruta en Colombia se concentra en la provincia de Vélez (Santander), donde se desarrolla en más de 130 fábricas de Bocadillo, cuya producción anual se valora en US\$24 millones. A pesar de su importancia socioeconómica, el cultivo y la agroindustria de la guayaba presentan aun un marcado retraso tecnológico que afecta su competitividad en los mercados y se refleja en bajos rendimientos del cultivo, altos costos de producción, deficiencias de calidad y en la

inestabilidad de la oferta, los precios de la fruta y sus productos procesados (Cordero *et al.* 2003, Insuasty *et al.* 2011).

En relación con el comercio exterior, la guayaba procesada como bocadillo, jalea, mermelada, compota, pulpa, néctar y jugo tiene una proyección amplia y creciente por las características o propiedades ya anotadas. Teniendo que desarrollar tecnologías que mejoren la productividad y competitividad con los mercados internacionales (Perales *et al.* 2005).

Para el consumo de los frutos en fresco, se requieren características específicas físicas como color y peso; en cambio para la industria, ni el tamaño, ni la apariencia de la fruta son importantes. Para el consumo en fresco, lo importante es que la fruta esté entera o completa y sin daños aparentes que la hagan rechazable por los consumidores. La industria prefiere fruta excelente no excedentes y no recibe fruta de mala calidad (Cordero *et al.* 2003, Lozano *et al.* 2002) al ser el daño que genera el picudo la principal causa de rechazo de la fruta tanto para el consumo en fresco, como para la industria.

#### **4.2.2 Aspectos agroecológicos**

El guayabo se adapta con facilidad a distintas condiciones climáticas pese a su origen tropical. El mejor clima para el guayabo es el templado, en sitios con temperatura promedio entre los 15 y 30°C, desde secos a húmedos, con un suplemento anual de agua de 1000 – 2000 m<sup>3</sup>/ha por año y se encuentra en una amplia variedad de climas (Chacón y Cuenca 1998, Insuasty *et al.* 2011, Salazar *et al.* 2006).

Desde el punto de vista fitosanitario este cultivo afronta una serie de problemas asociados con el ataque de plagas y enfermedades en donde se destacan: ataques de la mosca de la fruta del género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), el picudo de la guayaba *C. psidii* (Coleoptera: Curculionidae) y la enfermedad de la costra o clavo de la guayaba (*Pestalotia versicolor* Speg.), este hongo es favorecido por condiciones de alta humedad relativa y especialmente por exceso de follaje en la planta. En la región de Santander sobresale el picudo de la guayaba por el alto impacto económico que genera, ya que su efecto nocivo no permite el uso de la fruta en la preparación de (Insuasty *et al.* 2007, 2011, Perales *et al.* 2005).

---

Tanto la fruta como sus productos procesados, son la principal fuente de ingresos para la población de la provincia de Vélez, por lo que el problema con el picudo, genera pérdidas en los ingresos de las familias de la región y elevados costos en la producción de bocadillo al tener que importar la fruta desde otras regiones para suplir los requerimientos de las fábricas (Com. personal Hernández y Pinzón 2011).

Por el sistema de cultivo de guayabales silvestres, no se realizan aplicaciones de agroquímicos, ni embolsa del fruto para el control de plagas y enfermedades del fruto de guayaba. Específicamente para el picudo de la guayaba no se han desarrollado atrayentes ni feromonas eficaces para su implementación en manejo integrado de ésta plaga; tampoco se han realizado estudios de cultivares que sean resistentes o poco susceptibles (Insuasty *et al.* 2007). Prácticas culturales como recolección y eliminación de frutas afectadas son poco utilizadas en la región debido a la gran extensión de los cultivos, al poco número de árboles por área y por el aumento en la mano de obra; en los sistemas silvopastoriles esta labor es realizada en gran medida por el ganado, sin embargo, la fruta afectada por el picudo de la guayaba no es muy apetecida por los bovinos, los cuales consumen solo la porción del fruto que no se encuentra afectada, lo cual permite el desarrollo de la larva del picudo en la mayoría de ocasiones, sin verse interrumpido el ciclo de la plaga, lo cual mantiene su situación poblacional.

### **4.3 El picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)**

El picudo de la guayaba es una de las principales plagas del cultivo en Colombia no sólo por el tipo de daño que genera, sino también por el tamaño y la dispersión que están alcanzando sus poblaciones. El picudo de la guayaba puede llegar a petrificar la totalidad del fruto y si no se le controla, ocasiona pérdidas del 60 al 100% de la producción en un cultivo (Insuasty *et al.* 2007). En la provincia de Vélez (Santander) se ha incrementado significativamente las pérdidas causadas por el picudo, donde se estima que la producción de la guayaba ha reducido en un 80% y donde cada año llega a áreas donde antes no se habían registrado (Com. personal Hernández y Pinzón 2011).

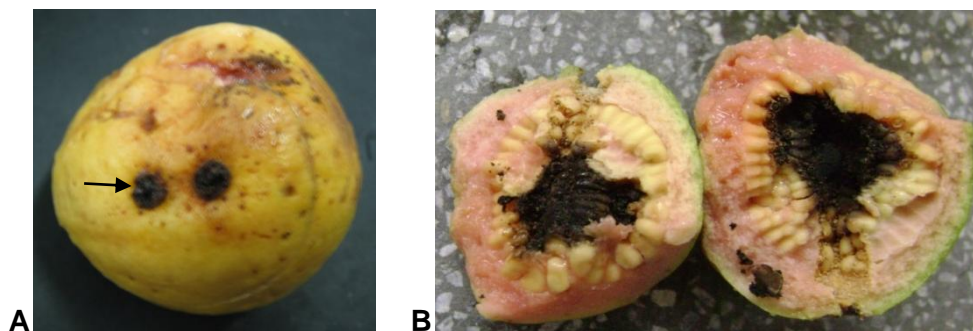
El picudo de la guayaba (*C. psidii*) es un escarabajo de la familia Curculionidae (Coleoptera) de aproximadamente 6 mm de largo y 4 mm de ancho. Las hembras

generalmente ovipositan un huevo por fruto de 30 a 90 días de edad; los huevos son blanquecinos y con longitud promedio de 1 mm. La larva es ápoda de color amarillo con cabeza café, con longitudes entre 1.2 y 1.5 mm en las primeras semanas y entre 10 y 12 mm en la sexta semana. La pupa es de tipo exarata, amarilla clara y de 7.5 mm de longitud. El adulto es café oscuro con piezas bucales cilíndricas y alargadas. Después de la eclosión del huevo, la larva penetra en el fruto donde se alimenta de la pulpa y de las semillas. Las larvas se desarrollan dentro del fruto pasando por cuatro instares. Los frutos se maduran, caen y las larvas de cuarto instar del picudo migran al suelo, donde se transforman en pupa, después surgen los adultos, los cuales abandonan el suelo para iniciar un nuevo ciclo. El ciclo del picudo fue descrito en condiciones de campo (25.3°C, 70% HR), en Barbosa-Santander; el ciclo dura en promedio 199 días, distribuido así: huevo, 4 a 7 días; la larva pasa por cuatro estadios larvales, del primero al tercero ocurren dentro del fruto, 42 a 56 días; el cuarto estadio larval ocurre en el suelo, 60 a 90 días; pupa en el suelo, 30 a 60 días. Los adultos emergen entre los 20 y 30 días y lo hacen durante la época seca, en la cual se pueden coleccionar adultos asociados a hojas y flores (Boscán y Cásares 1981, Monroy e Insuasty 2006, Insuasty *et al.* 2011).

En la provincia de Vélez los adultos emergen con la aparición de las primeras lluvias de marzo, incrementando significativamente su población en el mes de mayo. En cuanto a la infestación en los frutos por parte de las larvas, se ha observado el valor más alto durante la cosecha, que va desde inicios de septiembre hasta diciembre (Boscán y Cásares 1980, 1981, Insuasty *et al.* 2011).

El daño ocasionado por el picudo es provocado por la larva al alimentarse de la pulpa y la semilla, produciendo un ennegrecimiento, endurecimiento de la parte afectada, maduración prematura y caída del fruto. En la medida en que la larva se desarrolla en el interior del fruto, éste adquiere una forma arriñonada y el agujero de oviposición se torna más grande y de color oscuro, a las cuatro semanas de la oviposición los frutos se petrifican y su interior toma una apariencia totalmente oscura (Figura 3-1) (Insuasty *et al.* 2011). Un fruto en estas condiciones es inservible y no se puede consumir en fresco ni utilizar en la fabricación de pulpas o jaleas.





**Figura 3-1:** Fruto de guayaba (*P. guajava*) de 40 días. A. Daño externo generado por la hembra del picudo de la guayaba (*C. psidii*) al ovipositar en los frutos y la maduración prematura del mismo. B. Daño interno del fruto (petrificación) generado por larvas del picudo.

#### 4.4 Control del picudo de la guayaba

Dentro de las estrategias de manejo se encuentra el embolsado de frutos, red de golpe, eliminación de frutos infestados, selección de árboles trampa y desfase de cosecha. Sin embargo, estas prácticas requieren que los árboles sean manejados técnicamente, para evitar dificultades desde el punto de vista operativo y altos costos (Monroy e Insuasty 2006). El control se complementa con la colecta y quema de los frutos dañados en el árbol antes de que la larva abandone el fruto (Insuasty *et al.* 2011, Perales *et al.* 2005).

La plaga en sus estadíos larvales es difícil de controlar con métodos químicos, debido a su localización dentro del fruto en sus estadíos de larva 1 a la 3 y su posterior localización en el suelo en su estadío larval 4, y la capacidad de los adultos de evitar el contacto con el producto; aunado a esto, se encuentra la carencia de productos químicos específicos para el control del picudo (Boscán y Cásares 1980). Se ha registrado la aplicación de insecticidas tales como organofosforados para el control de adultos y de neonicotinoides para el control de larvas, sin obtener buenos resultados para el control de la plaga, por el contrario, presenta problemas de resistencia y contaminación (Dolinski *et al.* 2006, Souza *et al.* 2008, Insuasty *et al.* 2011)

Éstas medidas de control han resultado ineficientes por las dificultades que acarrea el cultivo en sistema silvestre haciendo que las pérdidas de producción de la guayaba continúen empeorando. Es por ello que se hace necesario una estrategia de control que sea autosostenible y que presente mejores resultados para el control del picudo. Una alternativa es la aplicación de estrategias de control biológico para la plaga, a fin de mantener un equilibrio en los ecosistemas, no obstante, falta estudiarse con mayor detalle para su implementación (Insuasty *et al.* 2007, Perales *et al.* 2005).

#### 4.4.1 Nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos son parásitos obligados de insectos; son invertebrados diversos y abundantes en diferentes sistemas en donde la humedad y la disponibilidad de alimento son factores importantes, por ello se desarrollan en ambientes crípticos como el suelo. Los estudios con nematodos entomopatógenos se han incrementado en las últimas dos décadas haciendo énfasis en el potencial infectivo de diferentes hospederos (Grewal *et al.* 2005, Kaya y Gaugler 1993).

Los nematodos entomopatógenos pertenecen al orden Rhabditida (Nematoda), en la cual están las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, las cuales han mostrado los mejores resultados para el control biológico. Steinernematidae posee dos géneros *Steinernema* (Travassos 1927) con más de 63 especies descritas y *Neosteinernema* (Nguyen y Smart 1994), con una especie descrita; y Heterorhabditidae posee un solo género *Heterorhabditis* (Poinar 1976) con unas 18 especies descritas (Grewal *et al.* 2005, Sayers 2009).

Los nematodos entomopatógenos que han mostrado mejores resultados en el control biológico de plagas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Están asociadas a bacterias mutualistas del género *Xenorhabdus* para Steinernematidae y *Photorhabdus* para Heterorhabditidae, que llevan en la vesícula o en el intestino, siendo en la mayoría de los casos una asociación especie de nematodo específica con la bacteria simbiote (Burnell y Stock 2000, Adams y Nguyen 2002, Morton y Garcia-del-Pino 2010). Las bacterias les son útiles cuando ingresan al hospedero ya que matan al insecto por septicemia (infección en la hemolinfa causada por microorganismos) y facilitan la degradación de los tejidos para que el nematodo se pueda alimentar junto con su

descendencia. La asociación nematodo-bacteria permite la efectividad y selectividad de estos controladores, razón por la cual se realizan gran variedad de ensayos en laboratorio para establecer la virulencia de cada especie ante una determinada plaga (Hazir *et al.* 2004, Sáenz 2005).

Entre las características que hacen a los nematodos entomopatógenos un grupo promisorio de controladores biológicos, pueden destacarse las siguientes: Alta virulencia y rápida acción al matar al hospedero; el tercer estado o juvenil infectivo (JI) no se alimenta, está morfológica y fisiológicamente adaptado para sobrevivir por largos períodos en el suelo en ausencia de su hospedero, el JI tiene la capacidad de parasitar los hospederos entran por la boca, ano, espiráculos y en algunos casos abriendo una abertura en la cutícula; tienen un alto potencial reproductivo y muestran respuesta numérica con respecto al hospedero, pueden criarse masivamente en laboratorio; tienen un amplio rango de acción, aunque algunos son muy poco específicos; los JI presentan alta resistencia a productos químicos y a condiciones ambientales adversas; tanto los nematodos entomopatógenos como sus bacterias, son inocuos para humanos y animales domésticos, no causan ningún daño a las plantas por ser específicos para insectos; algunas especies se pueden reproducir sin la presencia del macho, están exentos de registro para su comercialización en Europa y Estados Unidos; entre otras (Hazir *et al.* 2004, Klein 1990, Kaya y Gaugler 1993).

La eficacia del control de insectos plagas con nematodos entomopatógenos depende de la temperatura del suelo en el cual ellos son liberados. En general, la actividad insecticida de los nematodos entomopatógenos es mayor entre temperaturas de 18-28°C, con excepción de algunas especies que son más efectivas en temperaturas extremas. Otro factor que influye en la efectividad de los nematodos entomopatógenos es su baja tolerancia a la desecación, ya que necesitan una película de agua para poderse mover y su persistencia en el suelo depende de factores abióticos y bióticos como la producción de reservas alimenticias de lípidos, proteínas y carbohidratos, que son utilizadas por los nematodos para su movilidad, sobrevivencia, infectividad y reproducción (Kaya y Gaugler 1993).

Las estrategias de los JIs para encontrar a su hospedero es variable entre las distintas especies de nematodos entomopatógenos, se puede clasificar como “emboscadores” y “cruceros”. Los nematodos entomopatógenos “emboscadores” esperan a su hospedero

para saltar en dirección a su hospedero cuando éste se aproxima. Los nematodos entomopatógenos con estrategia “cruceiro” buscan activamente sus hospederos moviéndose en el suelo, probablemente atraídos por el dióxido de carbono u otras sustancias liberadas por los hospederos. Los nematodos entomopatógenos con estrategia de “cruceiro” son más efectivos para insectos con poca movilidad en la capa del suelo como el picudo de la guayaba, mientras que los “emboscadores” son más efectivos para hospederos móviles; existen adicionalmente, algunas especies intermedias con comportamientos “emboscadores” y “cruceiro” (Hazir *et al.* 2004, Klein 1990, Kaya y Gaugler 1993, Lewis 2002).

El ciclo de vida del aislamiento nativo *Heterorhbditis* sp. SL0708 fue descrito por Sáenz y López (2011) *in vivo* sobre larvas de *G. mellonella*, el cual posee un ciclo de vida largo de dos generaciones y uno corto de una generación; con ocho estados de desarrollo: huevo, cuatro estados juveniles (J1, J2, J3-JI, J4) separados por mudas, y adultos hermafroditas, machos y hembras, todos los estados son morfológicamente distintos. El ciclo tuvo una duración de 15-19 días desde la infección hasta la recuperación de JI y cada larva produjo en promedio 150.000 a 280.000JI. Los JIs de *Heterorhbditis* sp. SL0708 presentan estrategia de forrajeo tipo cruceiro (Sáenz y López 2011; Mejía y Sáenz 2013).

Se ha propuesto patogenicidad y virulencia como sinónimos, sin embargo, se plantea patogenicidad como la contribución genética, de forma cualitativa (es patogénico o no) y la virulencia es la contribución ambiental para el desarrollo de los síntomas, de forma cuantitativa (implica grados de virulencia), este último involucra establecimiento, desarrollo dentro del hospedero e infección. La infección incluye la habilidad de entrar y reproducirse en el hospedero (Thomas y Elkinton 2004).

#### **4.4.2 Control del picudo con nematodos entomopatógenos**

En Colombia no se han reportado estudios con nematodos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba, la información existente y cercana ha sido desarrollada en Brasil, donde se ha demostrado en laboratorio, invernadero y campo la eficacia de nematodos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (Dolinski *et al.* 2006, Del valle *et al.* 2005, 2008, Shapiro *et al.* 2008).

Nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhbditis* y *Steinernema* (Rhabditida) pueden ser usados como agentes de control biológico para los estadios del picudo de la

---

guayaba que se desarrollan en el suelo (cuarto estadio larval, prepupa y pupa). Estudios realizados por Del Valle *et al.* (2005, 2008) y Dolinski *et al.* (2006) demostraron la alta susceptibilidad del cuarto instar larval del picudo de la guayaba por parte de *Heterorhabditis baujardii* LPP7 (mortalidad 80%) y *Heterorhabditis indica* Hom1 (mortalidad 85%) en experimentos de laboratorio e invernadero a una dosis de 100 nemátodos por larva del gorgojo de la guayaba (Dolinski *et al.* 2006, Del valle *et al.* 2005, 2008). Cuando fueron evaluados en columnas de arena, estos nematodos se mostraron eficientes en encontrar las larvas del gorgojo, causan mortalidad del 70% bajo una dosis de 500 nematodos por larva; se realizaron algunas pruebas con nematodos en campo, demostrándose la eficacia y la persistencia de los nematodos en campo (Del Valle *et al.* 2008, Dolinski 2009).

Los nematodos entomopatógenos son aplicados generalmente en suspensión acuosa, donde los equipos de aplicación y la manera en la cual los nematodos son aplicados generan un impacto sustancial sobre el control de plagas (Shapiro-Ilan *et al.* 2006). En campo, un método alternativo para la aplicación de los nematodos entomopatógenos es la técnica de cadáveres infectados, la cual consiste en infectar larvas de último instar de *Galleria mellonella* con nematodos entomopatógenos, dejar que los nematodos se desarrollen dentro del huésped y posteriormente (entre los siete y quince días depende de la especie de nematodo), aplicar los cadáveres infectados; una vez entra en contacto con el sustrato, al presentarse las condiciones apropiadas para la emergencia (humedad), los JIs emergen de la larva aplicada en busca de un nuevo huésped. La técnica de cadáveres infectados ha mostrado mejores resultados que la aplicación de JIs en suspensión en cuanto a características como dispersión, infectividad y sobrevivencia, las cuales están directamente relacionadas con el almacenamiento de lípidos y trealosa de los JIs (Koppenhofer *et al.* 1997, Pérez *et al.* 2003, Shapiro y Glazer 1996, Shapiro y Lewis 1999, Shapiro *et al.* 2003).

Esta forma de aplicación por cadáveres-infectados es más sencilla y demanda menos tecnología tanto de almacenamiento, mantenimiento como de aplicación. Las larvas de *G. mellonella* pueden ser criadas, infectadas y aplicadas por los productores gracias a su fácil y económica producción y manejo. Los cadáveres infectados de *G. mellonella* se ubican a unos dos centímetros de la superficie del suelo, los JIs del cadáver migran a la lámina de suelo a los 3-5 días después de la aplicación y se desplazan en el suelo en búsqueda de su hospedero (plaga blanco) para completar su ciclo de vida y generar

nuevos JI. La distancia del desplazamiento, la profundidad y la persistencia que puedan alcanzar los nematodos va a depender de las condiciones ambientales como temperatura y humedad; de las condiciones bióticas como depredadores (tanto de los cadáveres infectados como de los JIs) y de las características de cada especie como lo es su estrategia de forrajeo, tolerancia a las condiciones ambientales, entre otras (Shapiro y Glazer 1996, Shapiro y Lewis 1999).

La técnica de aplicación por cadáveres infectados no se ha implementado en el país para el control de plagas. Esta técnica se evaluó en condiciones de campo para el control el picudo de la guayaba dada la factibilidad de aplicación por parte de los agricultores principalmente teniendo en cuenta el tipo de manejo que se le da a los guayabales silvestres; con la aplicación a gran escala de los cadáveres infectados se espera disminuir las poblaciones del picudo de guayaba (Del Valle *et al.* 2008)

## 5. Marco metodológico

### 5.1 Localización

Los ensayos de laboratorio e invernadero se realizaron en el laboratorio de Control biológico de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.

Los ensayos de campo se ejecutaron en el municipio de Guavatá – Santander, con una temperatura anual promedio de 19°C y un régimen de precipitación bimodal, con un promedio anual de 1800 y 1900 mm/año. En el municipio se seleccionó la finca El Reflejo por ser un lote homogéneo de guayaba de más de 2 ha de extensión, en el cual no se aplican agroquímicos en los últimos diez años y la presencia de la plaga es significativa (05° 55' 09.2" de latitud Norte y 73° 41' 37.5" de longitud Oeste; a 1922 m de altitud).

### 5.2 Material biológico

Picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)

Todos los ensayos se realizaron con larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba. Para la obtención de larvas se colectaron frutos infectados con la plaga, provenientes de Guavatá. En el laboratorio las larvas se separaron de acuerdo al estadio en el que se encontraba y las larvas de otros estadios se depositaron en bandejas plásticas con guayaba para permitir su desarrollo. Las larvas seleccionadas para los ensayos se dejaron 24 horas en observación antes de ser utilizadas, y se escogieron aquellas que se movían y presentaban coloración uniforme.

Cría de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Para la multiplicación de los Juveniles Infeccivos (JIs) de las diferentes especies de nematodos entomopatógenos, se crió *G. mellonella*. Se partió de larvas de último instar obtenidas de la empresa Bioagro. Las larvas se ubicaron en cajas plásticas multipropósito de 50X30x30 cm con tapa y se siguió la metodología propuesta por Realpe-Aranda *et al.* (2007) para establecer la cría en laboratorio.

Producción de nematodos entomopatógenos.

Las especies de nematodos entomopatógenos evaluadas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, obtenidas por el convenio de la Pontificia Universidad Javeriana con Cenicafé N. 182 (2009); además se evaluó una especie obtenida por la universidad (*Heterorhabditis* sp. SL0708), (Tabla 4-1). Para la producción de JI, se multiplicó cada especie de NEP sobre larvas de último instar de *G. mellonella* siguiendo las recomendaciones de Molina y López (2001), Sáenz y Olivares (2008) y Del Valle *et al.* (2008).

### 5.3 Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio.

Se realizó un ensayo completamente al azar de ocho tratamientos (7 especies de nematodos y un control sin nematodos) con 10 replicas cada uno y una repetición en el tiempo. Cada unidad experimental consistió en una caja de petri de 3 cm de diámetro, con 16 g de arena de río estéril (10% de humedad), se colocaron 100 JI y una larva de cuarto instar del picudo de la guayaba; se incubaron a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 15 días. Se registró la mortalidad diariamente. De acuerdo a los resultados se seleccionaron las especies que presentaron los mayores porcentajes totales de mortalidad para la evaluación de los ensayos posteriores (mortalidad superior al 70%). Las larvas muertas se montaron en trampas White modificada (Kaya y Stock 1997, Realpe-Aranda 2007) para comprobar la infectividad por parte de los nematodos.



**Tabla 4-1:** Nematodos entomopatógenos a evaluados para el control del picudo de la guayaba *C. psidii*. De la 1 a la 6 especies entregadas a la Pontificia Universidad Javeriana por Cenicafé con el convenio No. 182 de 2009. La 7 obtenida por la universidad.

No.	Género	Especie	Cepa	Municipio/ Departamento	Vegetación	PH	% contenido de arcilla: limo: arena
1	<i>Steinernema</i>	<i>websteri</i>	JCL006	Chinchiná - Caldas	Bosque, café - guamo	3.5-5.2 4.4-5.9	10-17: 23-33: 54-66 10-21: 14-24: 63-72
2	<i>Steinernema</i>	sp. 1	JCL024	Buenavista - Quindio	Bosque, Cafetal, Nogal cafetero	4.4-5.9	10-21: 14-24: 63-72
3	<i>Steinernema</i>	sp. 2	JCL007	Chinchiná - Caldas	Café - guamo	3.9-5.2 4.4-5.9	10-17:23-33: 54-66 10-21:14-24: 63-72
4	<i>Steinernema</i>	sp. 3	JCL027	Sasaima - Cundinamarca	Plátano	4.5	35:25:40
5	<i>Steinernema</i>	<i>colombiense</i>	SNI0198	Quimbaya - Quindio	Cafetal	4.9	Materia orgánica: 5.9%
6	<i>Heterorhabditis</i>	<i>bacteriophora</i>	HNI0100	Fresno -Tolima			
7	<i>Heterorhabditis</i>	sp.	SL0708	Alcalá - Valle del Cauca	Guadual	4.7	12.8: 19.8: 68.7

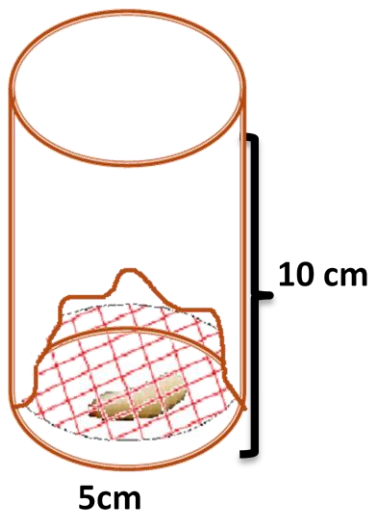


Se les evaluó la producción diaria de JI por larva de cuarto instar del picudo de la guayaba a las especies NEPs que presentaron porcentajes de mortalidad de más del 50%. Las larvas del picudo muertas se montaron en trampas White modificadas, se incubaron a 25°C y se evaluó la producción de los JI por larva cada 24 horas por quince días, lo que permitió verificar que posiblemente en campo se pueda infectar otras larvas o pupas de las diferentes generaciones que se desarrollan dentro del cultivo, las cuales serán afectadas por los mismos nematodos producidos en los cadáveres del picudo de la guayaba después de una aplicación con cadáveres de *G. mellonella*. Los conteos diarios se realizaron con el promedio de ocho muestras a partir de los 5ml de cada trampa White, cada muestra consistió en un volumen de 10 µl tomadas con una micropipeta Transferpette® S (D-100, Brand digital 10-100 µl).

### 5.3.1 Ensayo de columnas de arena.

Se usaron columnas de arena para evaluar la capacidad de los JI para desplazarse, encontrar y matar a las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba. Se seleccionaron dos especies de nematodos para realizar este ensayo a partir del ensayo de virulencia de JI en condiciones de laboratorio: *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024.

En cada ensayo se utilizó un tubo de PVC de 10 cm de alto por 5 cm de diámetro, en el lado inferior se dejó una caja de petri pequeña (5 cm de diámetro). En el fondo de cada tubo, se ubicó una larva de *C. psidii* ó de *G. mellonella* inmovilizada con anejo metálico (Fig. 4-1). Posteriormente se cubrió con sustrato estéril proveniente de la zona de estudio (54% arena, 26% arcilla, 19% sedimentos, pH: 4.6; 3.4% materia orgánica; 40% humedad) y sobre la columna se aplicó una de tres dosis de JI (0, 200 o 500 JI) en cada tubo. La dosis de 200 JI es la empleada en ensayos de efectividad de NEPs, mientras que la dosis de 500 JI es cercana a 250000 JI/m<sup>2</sup>, la cual es recomendada generalmente para aplicaciones en campo (Shapiro *et al.* 2006, Strong *et al.* 1996). Las columnas se taparon manteniendo la posición vertical y se incubó por 72 horas a 25°C. Se removieron las larvas muertas y se disectaron para verificar la presencia de nematodos. El diseño fue factorial de tres dosis, dos especies de nematodos y dos especies hospedero. Se realizaron 10 replicas por tratamiento y se repitió el experimento una vez en el tiempo.



**Figura 4-1:** Diagrama del montaje de la columna de arena. Tubo de PVC de 10 cm de alto por 5 cm de diámetro y en el fondo una larva del hospedero cubierto con anejo.

#### 5.4 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.

Los ensayos se realizaron en cajas plásticas (15x13x11 cm – 1.5L) tapadas con un tamiz plástico para evitar que las larvas se salieran. Las cajas se llenaron con 1000 cm<sup>3</sup> de suelo proveniente de la zona de estudio (54% arena, 26% arcilla), colectado en un lote de guayaba. El suelo se humedeció cada 2 días hasta la saturación, y se drenó el exceso de agua, para mantenerlo a capacidad de campo durante todo el experimento. En el fondo de cada caja se colocaron cuatro larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba 24 horas antes del montaje; se adicionaron cadáveres de *G. mellonella* infectados con los nematodos entomopatógenos que presentaron la mayor virulencia en los ensayos del laboratorio (*Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024), después de 14 días de infección. Los cadáveres se depositaron 2 cm por debajo de la superficie del suelo como lo propone Shapiro y Glazer (1996) y Shapiro y Lewis (1999). Los tratamientos estuvieron en un diseño completamente al azar, los cuales consistieron en la aplicación de 0 (control), 1, 2, 4 y 6 cadáveres infectados por unidad experimental. En cada tratamiento se realizó seis replicas y una repetición en el tiempo (1 mes). La mortalidad larval se observó después de 10 días del tratamiento. Para la evaluación de la mortalidad del picudo de la guayaba, se realizó un muestreo destructivo al remover la arena de cada caja. Las infecciones por parte de los nematodos se registraron como positivas cuando los

cadáveres de la plaga presentaron signos típicos de una infección por nematodos entomopatógenos (por ejemplo, color pardo y textura suave), dado que este método en campo es más preciso que las disecciones para determinar la patogenicidad por los JIs.

## 5.5 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.

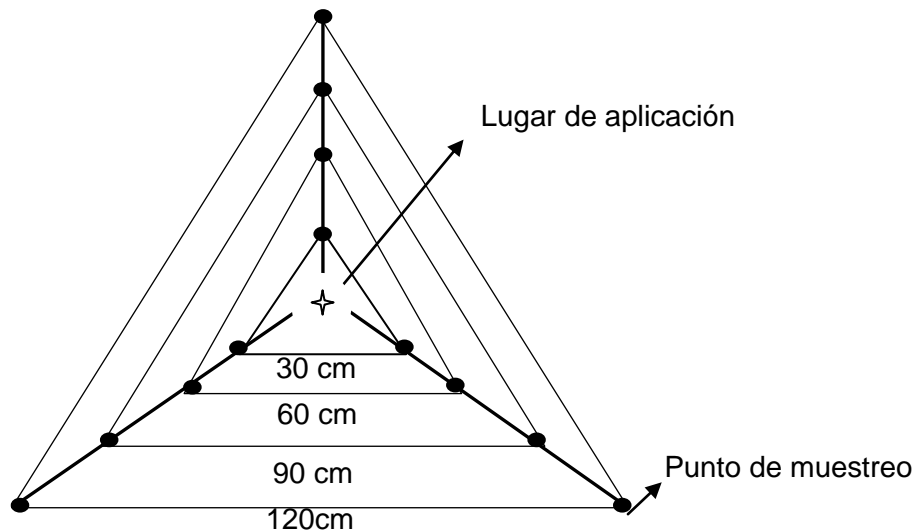
Este estudio se realizó en un cultivo de guayaba común con una densidad de siembra de 3 m<sup>2</sup> en Guavatá. Los ensayos se realizaron en octubre – diciembre, periodo en el que se presenta la transición de las larvas de *C. psidii* del fruto al suelo (de 3° a 4° instar larval). Desde el momento en que la larva cae al suelo, se aumenta la probabilidad de contacto de la plaga con el nematodo entomopatógeno. El periodo corresponde a la época húmeda, cuyas precipitaciones fueron constantes y abundantes.

Durante el experimento se monitoreó la composición del suelo (análisis gravimétrico) y su temperatura a 10 cm de profundidad; se mantuvo la humedad a capacidad de campo mediante drenajes dadas las intensas lluvias de la época de muestreo. Adicionalmente, se realizaron pruebas para evaluar la presencia de nematodos entomopatógenos (Kaya y Stock 1997). La especie de nematodo entomopatógeno a evaluar en la fase de campo: *Heterorhabditis* sp. SL0708, se seleccionó a partir de las pruebas de virulencia realizadas en laboratorio e invernadero.

Las parcelas experimentales consistieron de un área de 0.25 m<sup>2</sup> de suelo cubierto con polisombra de 90% a 20 cm de profundidad. Un día antes de los tratamientos, se colocaron a 3 cm bajo la superficie del suelo 50 larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba. Los tratamientos consistieron en la aplicación de diferentes número de cadáveres de *G. mellonella* (0, 1, 2, 4 y 6). Después de la aplicación, las parcelas fueron cubiertas cuidadosamente con pasto para simular las condiciones naturales. En las parcelas control no se aplicaron cadáveres de *G. mellonella*. Las parcelas y los tratamientos fueron dispuestos al azar entre las filas de los árboles de guayaba. Se evaluaron a los 7, 14 y 28 días cuatro parcelas, para establecer la mortalidad del picudo después de la aplicación de los tratamientos. En cada lectura, se removió el suelo cuidadosamente y se contó el número de larvas vivas y muertas, se removieron siempre las larvas vivas del cultivo y se dejaron allí las muertas para las pruebas de persistencia.

### 5.5.1 Dispersión de *Heterorhabditis* sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo.

El estudio de dispersión de los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708 consistió en dos tratamientos dispuestos en un diseño completo al azar con tres repeticiones (parcelas). La parcela se define como triángulos imaginarios situados entre los árboles de guayaba separados por lo menos en 5m de distancia (Figura 4-1).



**Figura 4-1:** Esquema de una parcela evaluada en cada muestreo; las muestras fueron tomadas en diferentes distancias y profundidades del lugar de aplicación de los cadáveres infectados de *G. mellonella* con *Heterorhabditis* sp. SL0708. Los puntos de colecta fueron cambiados en cada fecha de muestreo.

En el tratamiento 1 se aplicó un cadáver de *G. mellonella* infectado con *Heterorhabditis* sp. (Lugar de aplicación), mientras que en el tratamiento 2 se aplicaron 15 cadáveres, los cuales producen cerca de la dosis recomendada para aplicaciones en campo (250000 JI/m<sup>2</sup>- Shapiro *et al.* 2006, Strong *et al.* 1996), en este caso el área evaluada fue de 6 m<sup>2</sup> (diámetro: 120 cm). Los cadáveres se aplicaron a 5 cm de profundidad en el suelo en el centro de cada parcela e inmediatamente fue cubierto con suelo. En ambos tratamientos, los cadáveres fueron aplicados durante la época de invierno. Las muestras de suelo fueron tomadas a 1, 3, 5, 8 y 11 semanas después de la aplicación del cadáver para evaluar la dispersión y persistencia en el suelo del campo de *Heterorhabditis* sp. SL0708.

Encada fecha de evaluación se tomaron muestras en tres transectos al azar de cada parcela, las muestras fueron tomadas con la ayuda de un tubo de PVC de 8 cm de diámetro, el cual se introducía en el suelo y se extraía con la muestra de suelo en su interior, posteriormente con un palo se sacaba la muestra del tubo de PVC. Los transectos fueron muestreados a cuatro distancias de muestreo del punto de la aplicación de cadáver (30, 60, 90 y 120 cm) y en tres profundidades diferentes (0-10, 10-20 y 20-30 cm). En cada punto de muestreo, se tomó una muestra de suelo con el tubo de PVC en cada profundidad, con un total de 36 muestras por parcela en cada muestreo-fecha. Durante todo el período de muestreo, se tomaron 180 muestras por parcela y 540 muestras por el tratamiento (1080 muestras en total). Cada muestra constaba de 200 g de suelo, se homogeneizaba y se tomaba una submuestra de 100 g para su análisis en el laboratorio.

En el laboratorio, cada submuestra de 100 g se montó en un embudo Baermann, el cual se dejó reposar por 12 horas aproximadamente para la extracción de JIs (Stock 1998). Los JI vivos de *Heterorhabditis* sp. SL0708 se contaron con un microscopio-estereoscópico, los cuales se diferenciaron de otras especies de nematodos por su locomoción, tamaño característico y la morfología general.

### **5.5.2 Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo.**

El mismo suelo removido de las parcelas de las pruebas de virulencia en campo, fue utilizado para determinar la persistencia de los JI bajo condiciones naturales. La persistencia de los nematodos entomopatógenos en campo fue monitoreada en las parcelas cada 2 semanas por 3 meses, mediante la técnica modificada de insectos-cebo (Fan y Hominick 1991); para ello se tomaron 500 g de suelo, que se dividieron en cinco recipientes y en cada uno se adicionaron tres larvas de *G. mellonella*; se incubaron a 25°C en el laboratorio, siete días después se evaluó la mortalidad de las larvas.

## **5.6 Análisis estadístico**

La mortalidad de cada ensayo fue convertida a porcentaje. La mortalidad de los ensayos de invernadero y campo, se corrigieron con la fórmula de Abbott (1925).

Formula de Abbott:  $(IT-it / IT)*100$ ; IT: Infección testigo, it: infección tratamiento.

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad. Los datos que cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad se les realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA); y los datos que no cumplían con los supuestos se les realizó la prueba de Kruskal-Wallis (H), se usó el programa SPSS 19. Los ensayos con diferencias significativas entre los tratamientos se analizaron con una prueba *a posteriori* de Tukey (paramétrico) ó de Dunnet (No-paramétrico) a una significancia de  $P < 0.05$ , las diferencias se indican en las gráficas con diferentes letras sobre las barras.

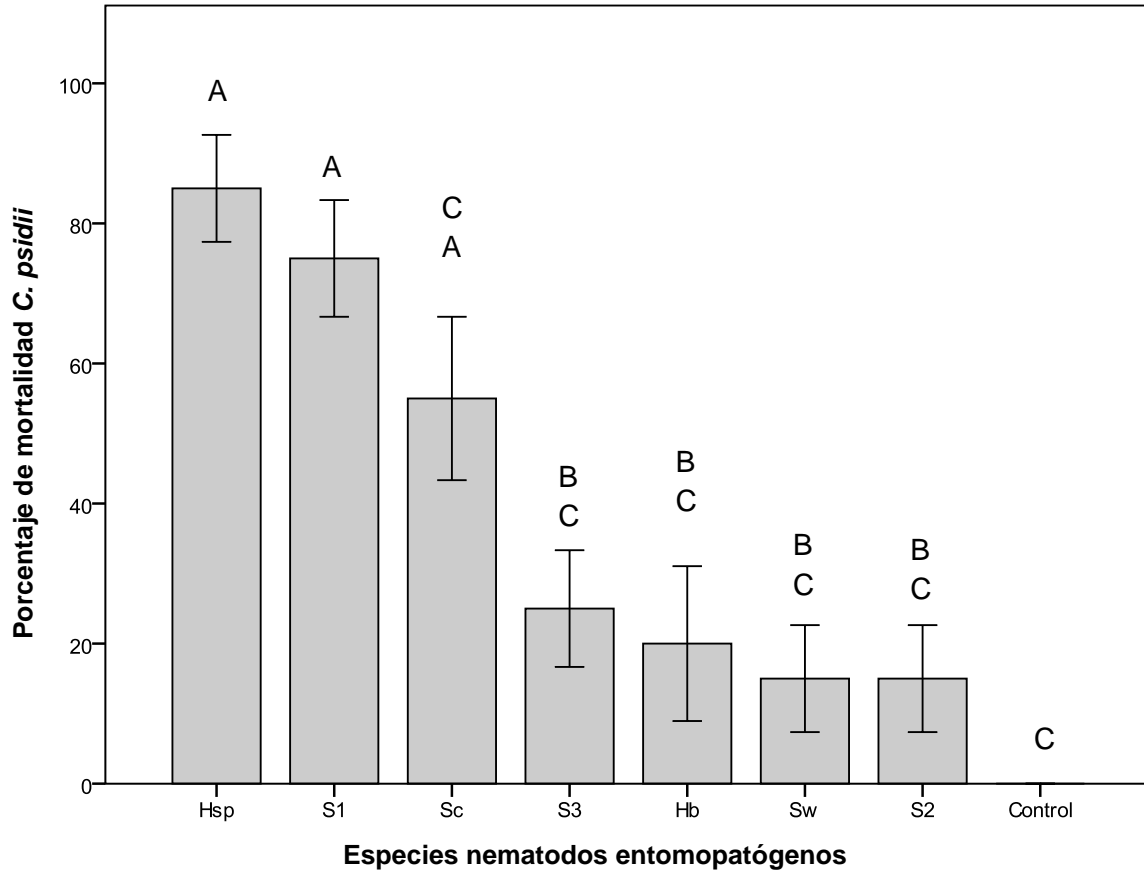
Dispersión: Los datos del promedio del número de JIs recuperados no se normalizaron con la transformación, se sometieron a análisis para determinar las diferencias estadísticas entre las distancias, las profundidades y las fechas de muestreo después de la aplicación, al nivel de significación del 5%.



## 6.Resultados

### 6.1 Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio

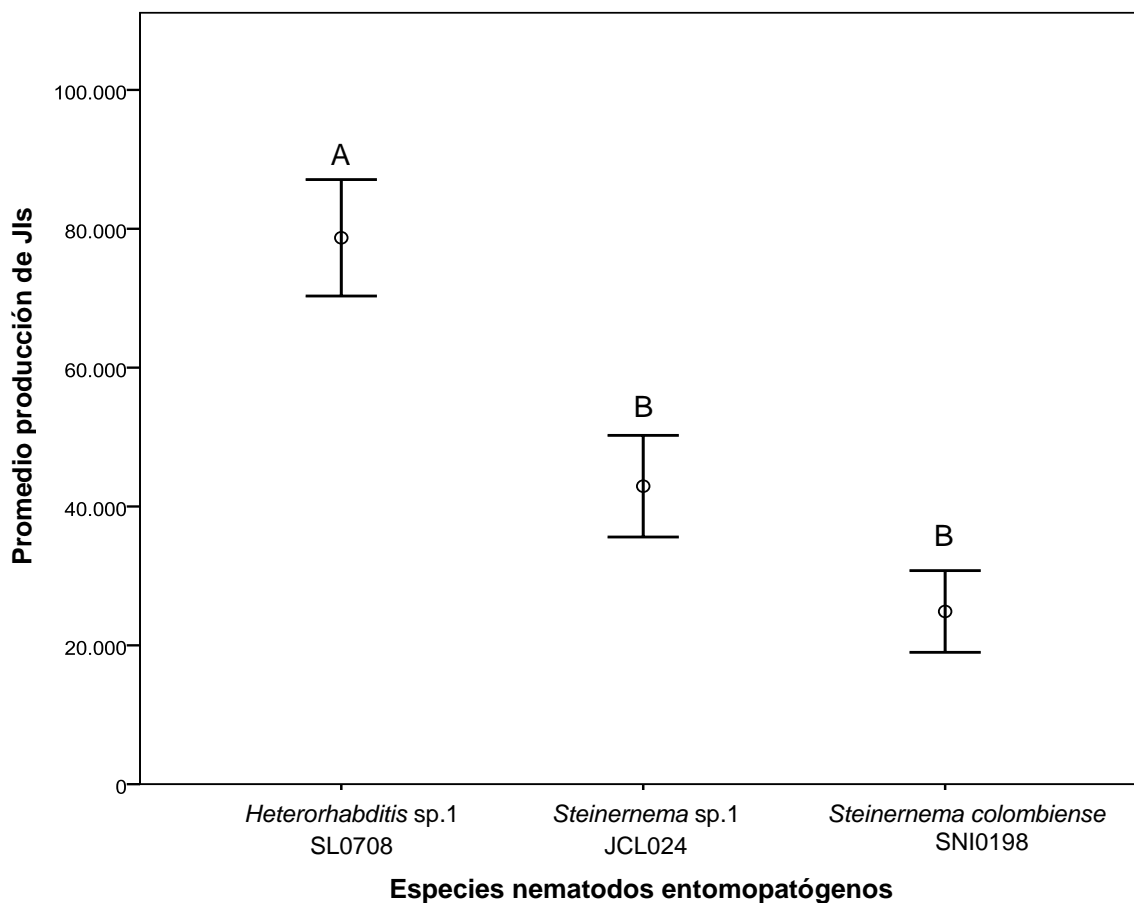
Se encontró que el picudo de la guayaba es susceptible a las siete especies de nematodos entomopatógenos evaluadas. La especie *Heterorhabditis* sp. SL0708 presentó el mayor porcentaje de mortalidad ( $85\pm 8\%$ ) seguida por *Steinernema* sp.1 JCL024 y *S. colombiense* SNI0198 ( $75\pm 8$  y  $55\pm 12\%$  respectivamente), estas tres especies de NEPs mostraron diferencias significativas ( $H=29.2$ ;  $gl=7$ ,  $69$ ;  $P<0.05$ ) con respecto al control ( $0\%$ ; Figura 5-1). Las otras especies de nematodos evaluadas *Steinernema* sp.3 JCL027, *H. bacteriophora* HNI0100, *S. websteri* JCL006 y *Steinernema* sp.2 JCL007 presentaron de 25 al 15 % de mortalidad sobre las larvas del picudo. Respecto al tiempo, la mortalidad en el 80% los tratamientos se registró en las primeras 48 horas, hasta las 72 horas.



**Figura 5-1:** Promedio del porcentaje de mortalidad ( $\pm$ ES) de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba (*C. psidii*) causada por la exposición a 100JI / larva de siete especies de nematodos entomopatógenos evaluados. H1: *Heterorhabditis* sp. SL0708; S1: *Steinernema* sp.1 JCL024; Sc: *Steinernema colombiense* SNI0198; S3: *Steinernema* sp.3 JCL027; Hb: *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100; Sw: *Steinernema websteri* JCL006; S2: *Steinernema* sp.2 JCL007. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnett,  $P \leq 0.05$ ).

*Heterorhabditis* sp. SL0708, *Steinernema* sp.1 JCL024 y *S. colombiense* SNI0198 fueron las especies que presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 50%, sobre las cuales se evaluó la producción de JI/larva del picudo de la guayaba. La mayor producción se registró al tercer día, y el 80% de producción de los JI se alcanzó en los primeros ocho días, con aumentos en la producción algunos días después en las tres especies evaluadas. *Heterorhabditis* sp.1 fue la especie que produjo el mayor número promedio de JI por larva ( $78701 \pm 8387$ ), seguido por *Steinernema* sp.1 ( $42924 \pm 7319$ ) y *S. colombiense*

(24879±5885; Figura 5-2). Se presentaron diferencias estadísticas ( $F=12.6$ ;  $gl=2, 41$ ;  $P<0.05$ ) entre *Heterorhabditis* sp. SL0708 y las otras dos especies.

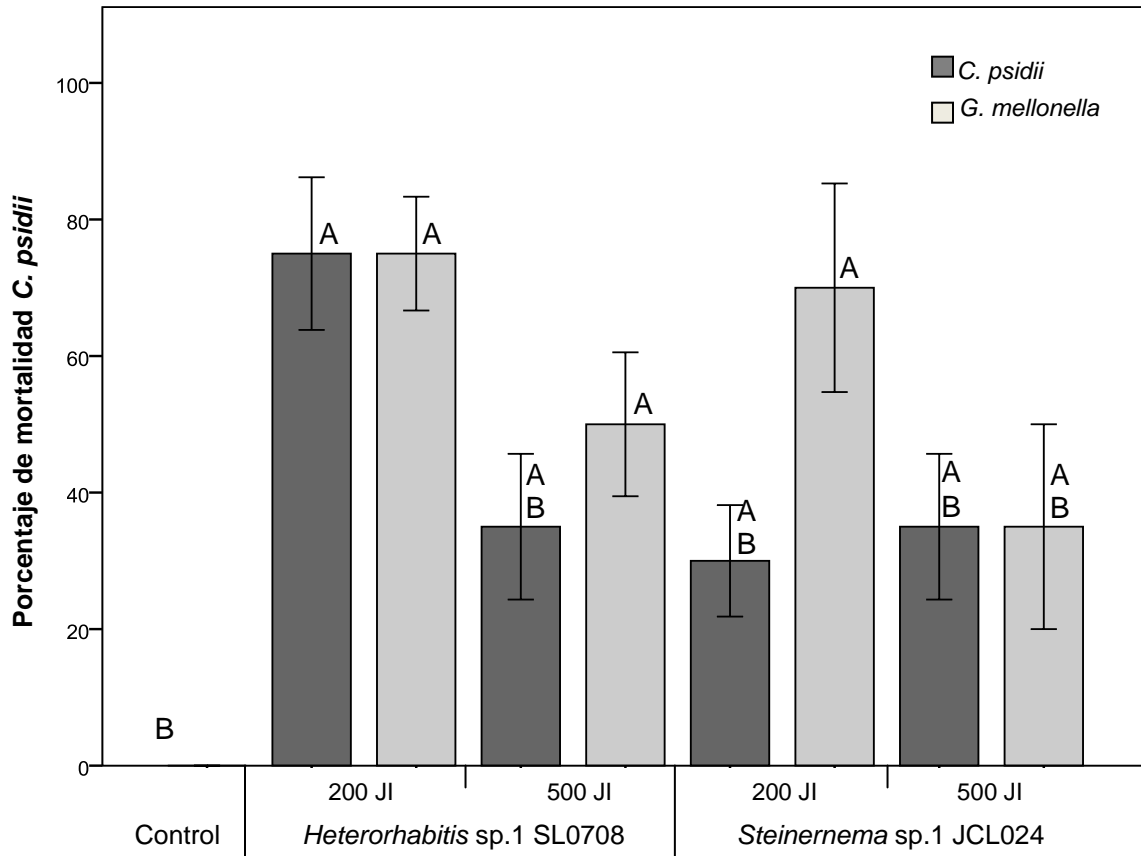


**Figura 5-2:** Producción promedio de JI ( $\pm$ ES) de tres especies de nematodos entomopatógenos por larva de cuarto instar del picudo de la guayaba *C. psidii*. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey,  $P\leq 0.05$ ).

### 6.1.1 Ensayo de columnas de arena.

Para las pruebas de las columnas de arena se evaluó *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 por presentar porcentajes de mortalidad superiores al 70% y mayor producción de JI por larva. No se registraron diferencias significativas ( $H=31.4$ ;  $gl=2, 99$ ;  $P>0.05$ ) entre los porcentajes de mortalidad de *C. psidii* y *G. mellonella*, pero si entre estos dos huéspedes con el control y entre las dosis ( $H=30.7$ ;  $gl=8, 89$ ;  $P<0.05$ ; Figura 5-3). *Heterorhabditis* sp. SL0708 presentó el mayor porcentaje de mortalidad sobre larvas del picudo de la guayaba ( $75\pm 11\%$ ) en la dosis de 200 JI; en la dosis de 500 JI la

mortalidad fue menor ( $35\pm 11\%$ ). *Steinernema* sp.1 JCL024 sobre larvas del picudo generó una mortalidad de  $30\pm 26$ - $35\pm 34\%$ . Para *G. mellonella*, las dos especies de nematodos evaluadas mostraron mortalidad entre 75 y 35% (dosis de 200 y 500 JI respectivamente).

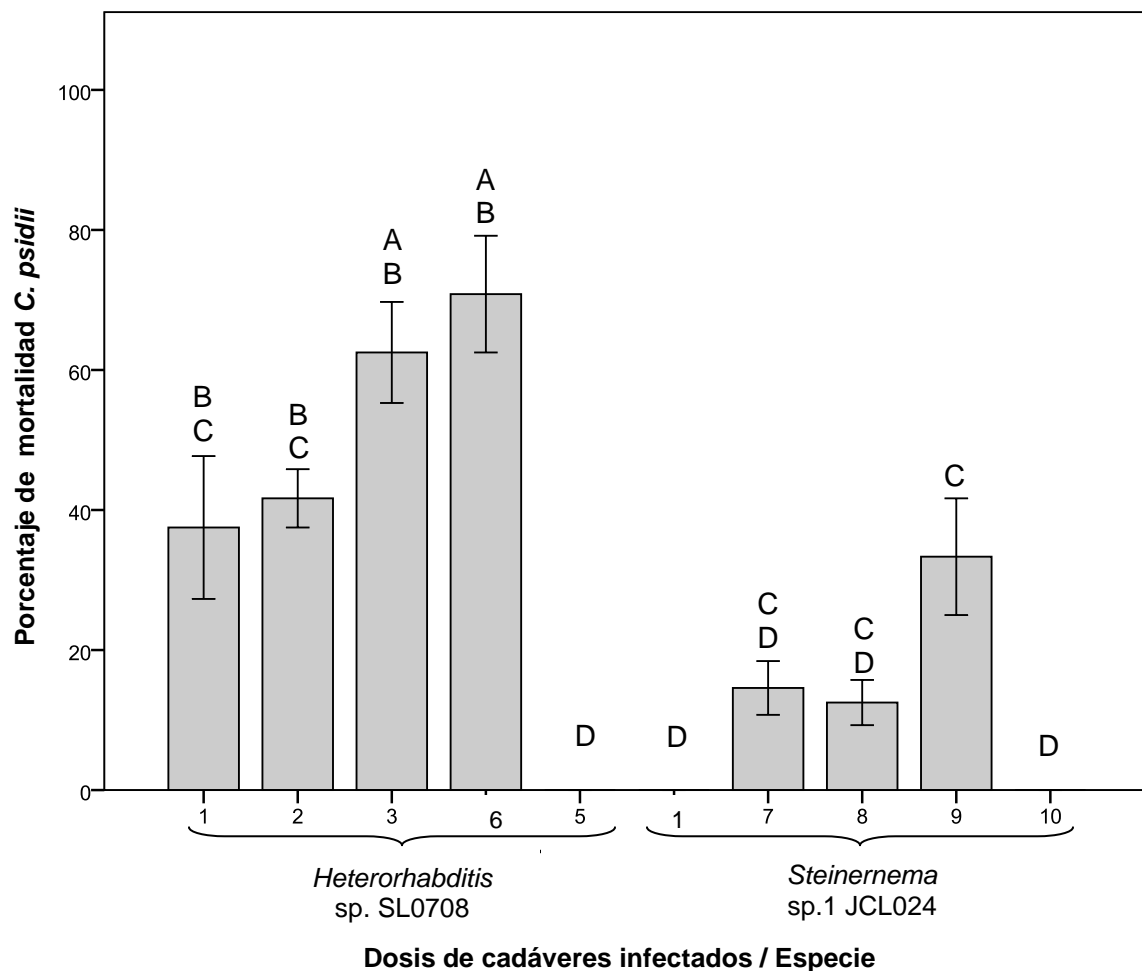


**Figura 5-3:** Promedio del porcentaje de mortalidad ( $\pm$ ES) de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba (*C. psidii*) y de larvas de último instar de *G. mellonella* causada por *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 en dosis de 200 JI y 500 JI en las columnas de arena. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnett,  $P \leq 0.05$ ).

## 6.2 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.

En condiciones de invernadero se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad de las dos especies de nematodos entomopatógenos evaluadas (*Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024) y el control ( $H=39.1$ ;  $gl=2$ , 58;  $p < 0.05$ ) y entre las dosis de cadáveres infectados aplicados para cada especie

de nematodo ( $F=19.3$ ;  $gl=9, 58$ ;  $P=0.04$ ; Figura 5-4). *Heterorhabditis* sp. SL0708 presenta los mayores valores de mortalidad para 1, 2, 4 y 6 cadáveres aplicados ( $37.5\pm 10$ ,  $41.7\pm 4$ ,  $62.5\pm 7$  y  $70.8\pm 8$  respectivamente); mientras que los porcentajes de mortalidad de *Steinernema* sp.1 JCL024 están entre  $33\pm 8$  y  $12.5\pm 3\%$ , donde todos los tratamientos de *Heterorhabditis* sp. SL0708 son estadísticamente diferentes al control.

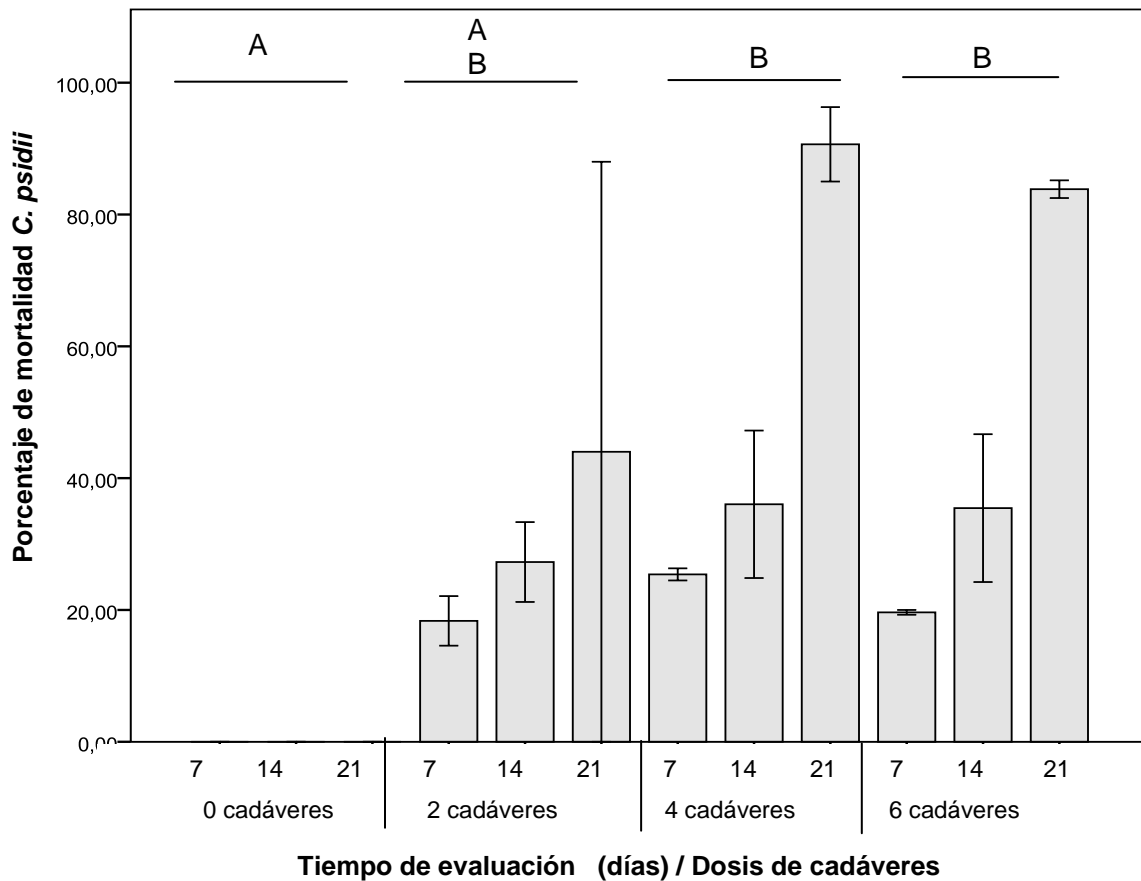


**Figura 5-4:** Promedio porcentaje de mortalidad ( $\pm$ ES) de larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba (*C. psidii*) causada por *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 en cinco dosis de cadáveres de *G. mellonella* (0, 1, 2, 4 y 6 cadáveres) en condiciones de invernadero. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

### 6.3 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.

Durante los experimentos de campo la temperatura promedio del suelo a una profundidad de 10 cm fue de 18.6°C (18.4 - 18.9), y el contenido de agua en el suelo varió entre 88 – 95% humedad. Las precipitaciones fueron superiores a las registradas en años anteriores (2613 mm/año), donde los meses de octubre, noviembre y diciembre presentaron 201, 330 y 331 mm respectivamente.

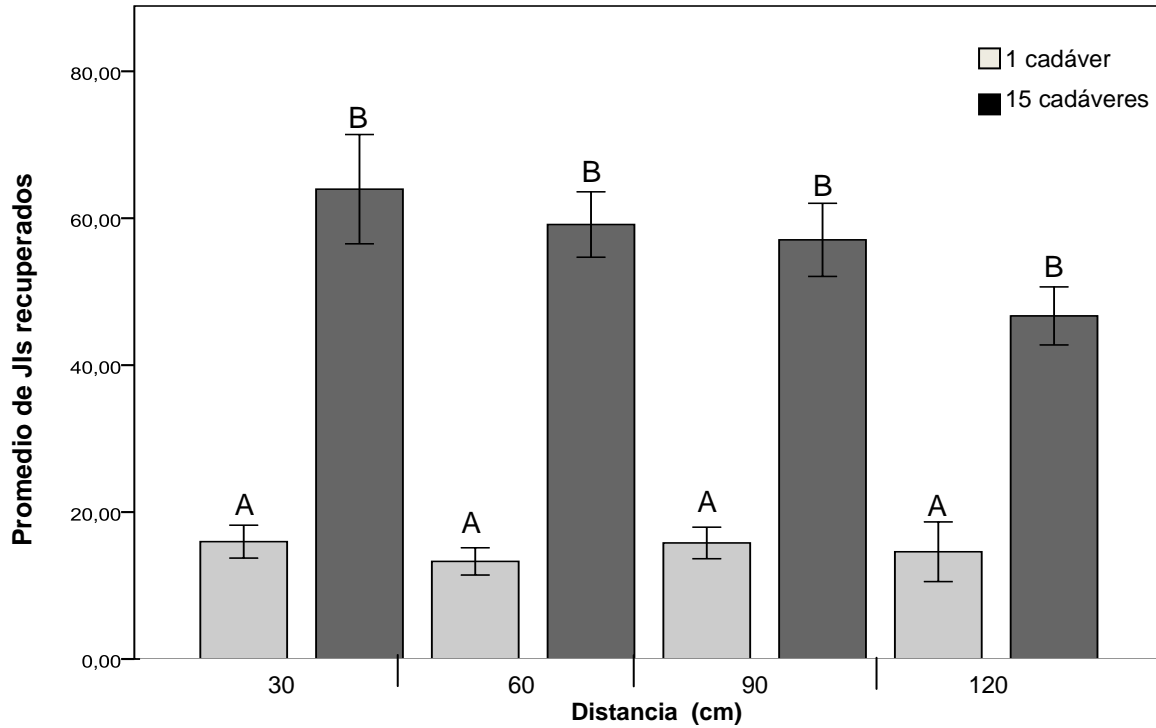
Se encontraron diferencias estadísticas entre el control y la aplicación de 4 y 6 cadáveres infectados con *Heterorhabditis* sp. SL0708 ( $H=2.6$ ;  $gl=2, 23$ ;  $P=0.273$ ), pero no cuando se aplicaron 2 cadáveres (Figura 5-10). Cuando se analiza por fechas, también se registran diferencias significativas ( $H=18.2$ ;  $gl=11, 23$ ;  $P=0.078$ ), donde el muestreo a los 21 días es el diferente, cuyos valores de mortalidad fueron de  $91\pm 6$  y  $84\pm 1\%$  cuando se aplicaron 4 y 6 cadáveres infectados respectivamente.



**Figura 5-5:** Promedio del porcentaje de mortalidad corregido (Abbott±ES) de las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba (*C. psidii*) causada por 0, 2, 4 o 6 cadáveres infectados con *Heterorhabditis* sp. SL0708 en campo, a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet,  $P \leq 0.05$ ).

### 6.3.1 Dispersión de *Heterorhabditis* sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo.

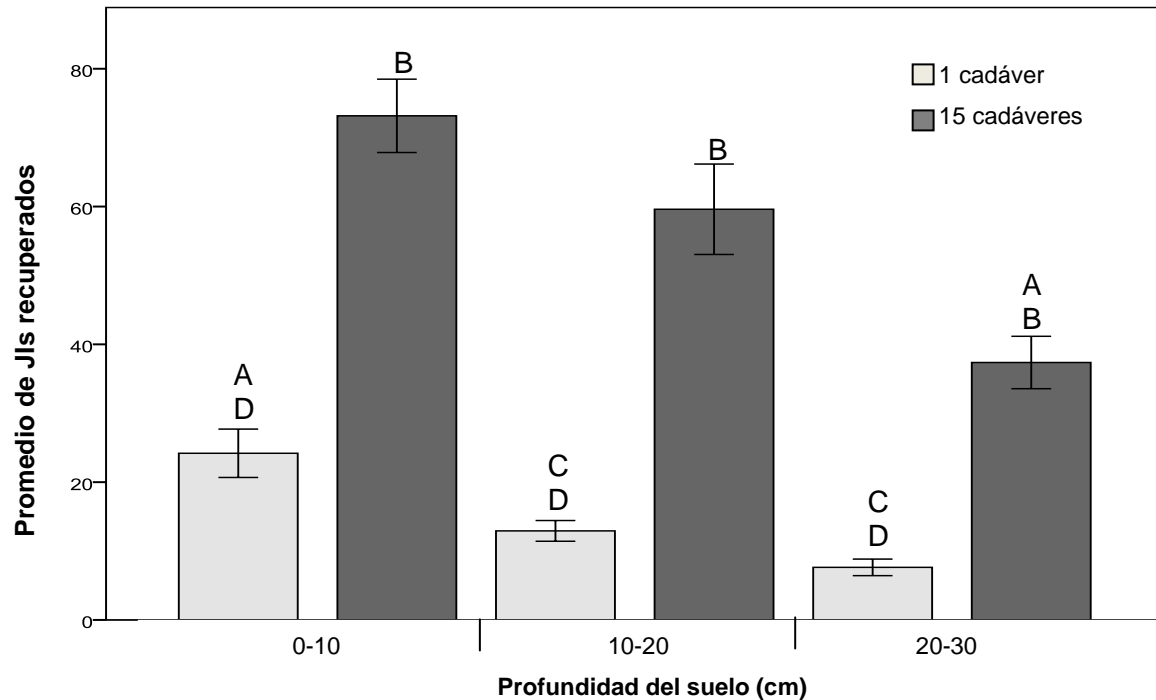
En el ensayo de recuperación de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 aplicados mediante la técnica de cadáveres infectados en campo, se recuperaron en total JI en 852 muestras de las 1080 muestras analizadas (78.9%). En el tratamiento 1 el 34.5% de las muestras fueron positivas, y en el tratamiento 2 el 43.5% de las muestras fueron positivas. El número total de JI recuperados a 30cm de distancia fueron 719.4 ( $40 \pm 7$ ), a 60cm: 651.9 ( $36 \pm 6$ ), a 90cm: 655.7 ( $36 \pm 6$ ) y a 120cm: 551.7 ( $31 \pm 5$ ). El número potencial de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 que se pueden recuperar por larva de *G. mellonella* es de 150000 a 280000 (Sáenz y López 2011). El número promedio de JIs recuperados no difieren estadísticamente entre el punto de aplicación y las distancias ( $F=0.43$ ;  $gl=3, 71$ ;  $P=0.735$ ) para los dos tratamientos. Pero hay diferencia en el número de JI recuperados entre la aplicación de uno o 15 cadáveres con respecto a las distancias ( $H=53.8$ ;  $gl=7, 71$ ;  $P < 0.05$ ; Figura 5-5).



**Figura 5-6:** Promedio ( $\pm$ ES) del JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes distancias del punto donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnett,  $P \leq 0.05$ ).

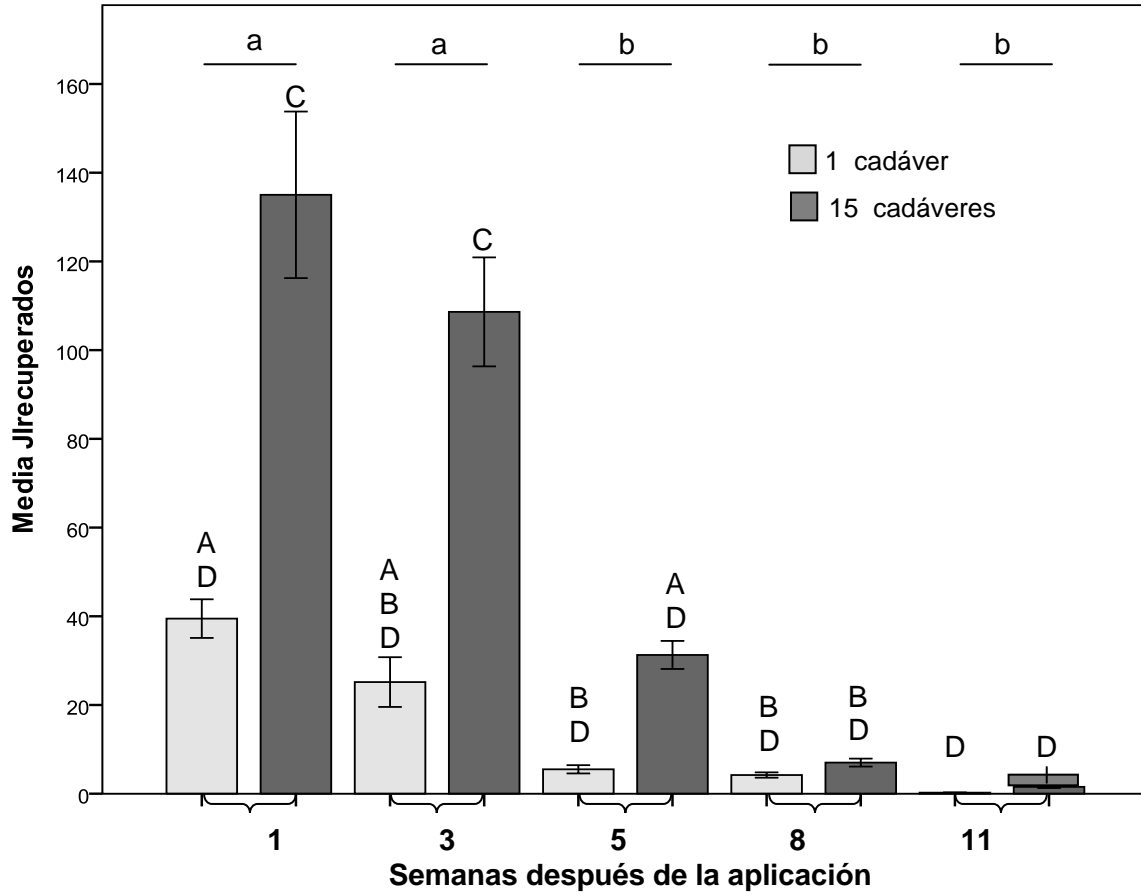
A partir de las tres profundidades evaluadas, se recuperaron en promedio más JI en 0-10 cm: 876.2 ( $49 \pm 7$ ), que en 10-20 cm: 852.8 ( $36 \pm 7$ ) o 20-30 cm: 405 ( $23 \pm 4$ ). Se presentaron diferencias significativas entre las profundidades ( $F = 4.9$ ;  $gl = 2, 53$ ;  $P = 0.011$ ) para cada uno de los tratamientos (Figura 5-6). Al comparar los tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre los dos para las profundidades muestreadas ( $H = 44.8$ ;  $gl = 5, 53$ ;  $P < 0.05$ ).





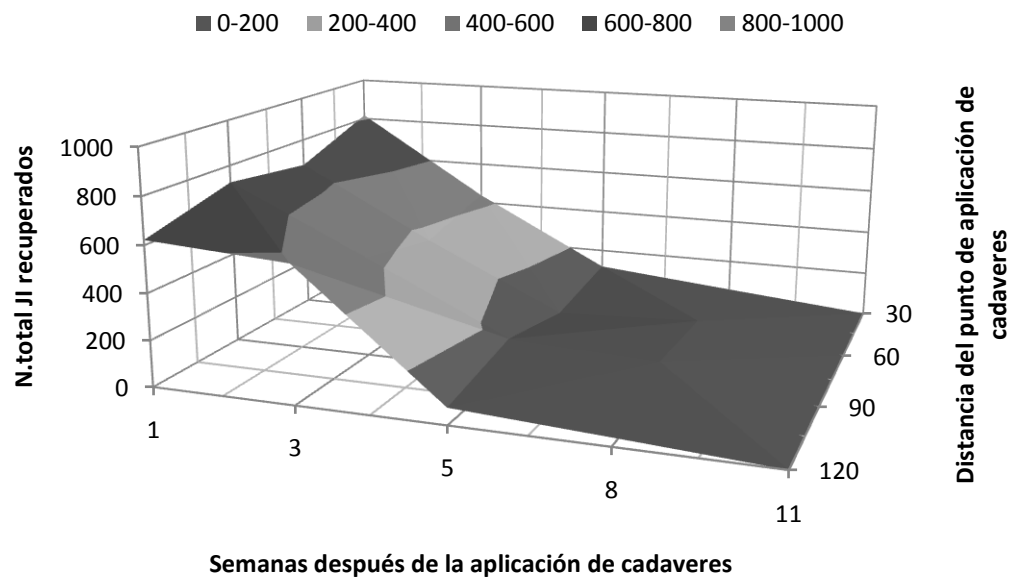
**Figura 5-7:** Promedio ( $\pm$ ES) de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnett,  $P \leq 0.05$ ).

El mayor número de muestras positivas fueron la primera y tercera semana después de la aplicación (95.8%), al igual que la mayor recuperación de JIs fue en estas semanas, las cuales presentaron diferencias significativas con las siguientes semanas evaluadas ( $H=69.8$ ;  $gl=4$ , 89;  $P \leq 0.05$ ) para los dos tratamientos (Figura 5-7). Dentro de cada tratamiento se presentan diferencias significativas en las semanas evaluadas ( $H=82.9$ ,  $gl=9$ , 89.  $P < 0.05$ ).

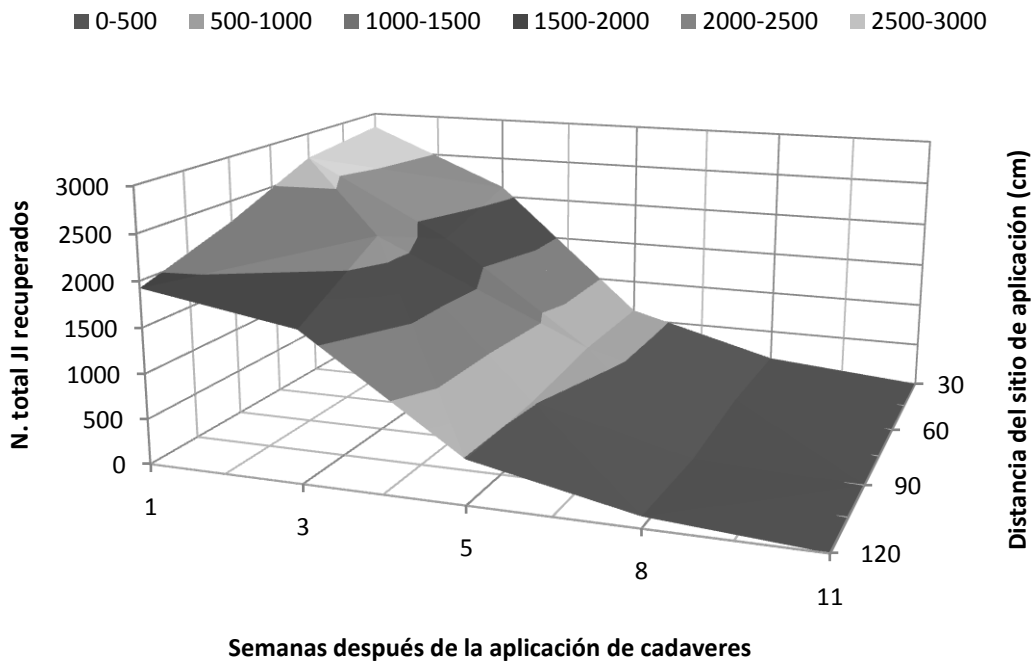


**Figura 5-8:** Promedio ( $\pm$ ES) del número de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes fechas de muestreo donde se aplicaron 1 ó 15 cadáveres. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnett,  $P \leq 0.05$ ).

El número total de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 en diferentes distancias del punto de aplicación de 1 y 15 cadáveres, a lo largo de las 11 semanas evaluadas se muestra en las figuras 5-8 y 5-9.



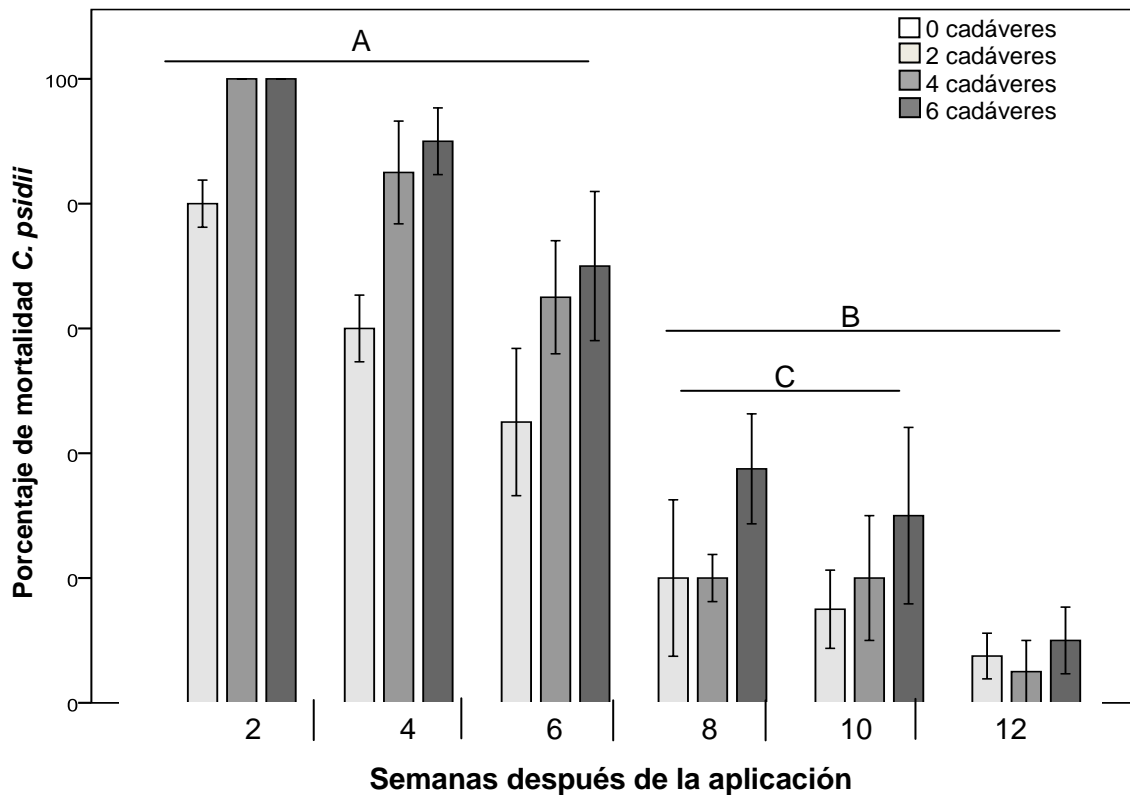
**Figura 5-9:** Distribución espacial y temporal del número total de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicó 1 cadáver.



**Figura 5-10:** Distribución espacial y temporal del número total de JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 recuperados de 1080 muestras de suelo tomadas en diferentes profundidades del punto donde se aplicaron 15 cadáveres.

### 6.3.2 Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo.

En cuanto a las pruebas de persistencia de los JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 en campo, se registró virulencia hasta la semana doce de evaluación. Se registraron diferencias significativas entre las fechas de aplicación de los cadáveres infectados ( $H=57.8$ ;  $gl=5$ , 191;  $P<0.05$ ), dividiéndose en dos grupos principales (Fig. 5-11 A y B), también se registraron diferencias significativas entre el número de cadáveres aplicados y las fechas de aplicación ( $H=146.6$ ;  $gl=23$ , 191;  $P<0.05$ ). La mayor virulencia se registró en las primeras semanas de evaluación, disminuyen en las siguientes.



**Figura 5-11:** Promedio del porcentaje de mortalidad de las larvas de último instar del *G. mellonella* causada por 0, 2, 4 o 6 cadáveres infectados con *Heterorhabditis* sp. SL0708 en campo, a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas después de la aplicación. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (Dunnet,  $P\leq 0.05$ ).

## 7. Discusión

En las pruebas de evaluación de las diferentes especies de nematodos entomopatógenos en laboratorio se destacaron *Heterorhabditis* sp. SL0708 y *Steinernema* sp.1 JCL024 por su mayor virulencia, sin sobresalir las especies de uno u otro género en los porcentajes de mortalidad. En las pruebas de columnas de arena e invernadero, estas dos especies de nematodos entomopatógenos fueron capaces de encontrar y matar las larvas del picudo de la guayaba, donde *Heterorhabditis* sp. SL0708 mostró mayor mortalidad larval. En campo, esta misma especie tiene la capacidad no solamente de desplazarse vertical y horizontalmente, sino también de persistir en el tiempo con capacidad virulenta. Estas pruebas demuestran la habilidad de éste nematodo de encontrar y matar las larvas del picudo de la guayaba en temperatura y condiciones del suelo característicos de la zona guayabera de Santander en época de invierno, cuando el picudo de la guayaba se encuentra en estadio larval cuatro.

### 7.1 Pruebas de virulencia de JI en condiciones de laboratorio

En los ensayos de laboratorio se aplicaron 100 JI/larva como se ha propuesto en la literatura (Kaya y Stock 1997), para evaluar la susceptibilidad de un hospedero y realizar el proceso de selección de la especie de nematodo entomopatógeno potencial para ser implementada como agente de control biológico. De las pruebas de laboratorio, las siete especies de nematodos evaluadas produjeron mortalidad larval, donde una especie de *Heterorhabditis* y una de *Steinernema* generaron mortalidades significativamente mayores a las otras especies. Dolinski *et al.* (2006) evaluaron nueve especies de nematodos entomopatógenos en larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba, quienes plantean que las especies de *Heterorhabditis* fueron más virulentas (80-75%) que las especies de

*Steinernema* (65-45%), lo que difiere con el presente estudio, donde *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 presentó 25% mortalidad.

El tiempo de mortalidad registrado para todas las especies de nematodos entomopatógenos sobre *C. psidii* (<72 horas) fue menor en el presente estudio, a la que se ha registrado para esta plaga, la cual se encuentra en los primeros tres días para *H. baujardi* LPP7 (Del Valle *et al.* 2005), diez días para *H. indica* y 44 días para *S. riobrave* (Dolinski *et al.* 2006). El presente estudio se realizó con larvas recién emergidas del fruto, aproximadamente de seis semanas, mientras que en los estudios de Del Valle *et al.* (2005) y Dolinski *et al.* (2006) se realizaron con larvas que se encontraban al final de su cuarto estadio larval, terminando sus ensayos en estado de prepupa; estos resultados son coincidentes con lo registrado para el picudo de la nuez *Curculio caryae*, cuyas larvas más maduras parecen ser más resistentes a la infección de los nematodos entomopatógenos que las larvas más jóvenes (Shapiro-Ilan 2002). En el caso de *C. psidii*, el cuarto estadio larval es el estado en el cual abandona el fruto para profundizarse en el suelo, se vuelve inactivo y se convierte en prepupa; la prepupa es morfológicamente similar al cuarto instar larval, pero es un poco más pequeña, su cutícula pierde humedad y se vuelve más dura (Monroy *et al.* 2006), por lo que el avance de sus estadios puede afectar posiblemente la capacidad de penetración de los nematodos entomopatógenos.

La evaluación de la producción de JIs a partir de larvas de *C. psidii* se realizó para las tres especies más virulentas: *Heterorhabditis* sp. SL0708, *Steinernema* sp.1 JCL024 y *S. colombiense* SNI0198. La producción acumulada de los JIs para *Heterorhabditis* sp. SL0708 en larvas de *G. mellonella* es de 150000 a 280000 JI/larva, estos valores son correspondientes a lo obtenido para *C. psidii* (74071), teniendo en cuenta que éste representa un poco menos de la mitad del peso comparado con *G. mellonella*; para *H. bacteriophora* la producción acumulada es de 78750 JI/larva de *G. mellonella* y para *S. colombiense* es de 86250 JI/larva (Realpe-Arada *et al.* 2007). Adicionalmente, estas producciones pueden ser muy variables, ya que oscilan entre 30000 y 240000 JI/larva dentro del mismo hospedero, dependen principalmente de la capacidad del hospedero para suplir los requerimientos nutricionales de los nematodos (Sáenz y Luque 2000).

El tiempo de producción de los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708, *Steinernema* sp.1 JCL024 y *S. colombiense* SNI0198 a partir de larvas de *C. psidii* es similar a lo registrado en larvas de *G. mellonella*, donde la producción es mayor en los primeros 3 días y

disminuye a través del tiempo, y durante los diez primeros días de emergencia se obtienen las mayores producciones de nematodos, con un 90% de los JI (Sáenz y Luque 2000, Sáenz y López 2011). La producción de los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708 inició a los 7-10 días después de la infección, por lo que se puede decir que éste nematodo presenta dentro del picudo de la guayaba un ciclo de vida largo y uno corto, según lo reportado en *G. mellonella* (Sáenz y López 2011).

### 7.1.1 Ensayo de columnas de arena.

Los ensayos en las columnas de arena permitieron evaluar la capacidad de búsqueda e infección de las especies de nematodos entomopatógenos, cuyos porcentajes de mortalidad en laboratorio fueron superiores al 70%. Se encontró que *Heterorhabditis* sp. SL0708 tiene mayor capacidad que *Steinernema* sp.1 JCL024 de encontrar y matar las larvas de *C. psidii* en la dosis de 200 JI; pero los porcentajes de mortalidad no difieren entre las dos especies de nematodos cuando el hospedero es *G. mellonella*. Dolinski *et al.* (2006) realizaron pruebas en columnas de arena para el picudo de la guayaba con dos especies de *Heterorhabditis* y una de *Steinernema*, donde los heterorhabditidos presentaron mayor mortalidad larval (70-80%), lo cual coincide con el presente estudio; sin embargo, esos porcentajes de mortalidad se alcanzaron en la dosis de 500 JI y en el presente estudio se alcanzaron en la dosis de 200 JI. La dosis de 200 JI corresponde a  $1 \times 10^9$  JI/ha, la cual es menor a la dosis de  $2.5 \times 10^9$  JI/ha que se ha registrado en la mayoría de los casos para que los nematodos entomopatógenos sean efectivos al ser aplicados al suelo (Grewal 2002, Wilson *et al.* 2003). En situaciones donde el hospedero es particularmente susceptible ó en condiciones controladas, tales como en laboratorio e invernadero, dosis menores de las aplicaciones también pueden ser efectivas (Leite *et al.* 2005).

Las dos especies de nematodos entomopatógenos presentaron porcentajes de mortalidad elevados para *G. mellonella* (70-75%) en las pruebas de las columnas de arena, lo que indica que las dos especies tienen la capacidad de desplazamiento vertical en 10 cm de profundidad, la cual es la distancia promedio en la que se encuentran las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba en el suelo. Este desplazamiento indica que las especies presentan estrategia de forrajeo tipo “cruceiro” (búsqueda extensiva), los cuales son más efectivos en encontrar el recurso sedentario y críptico que los tipo “emboscadores” (Kaya y Gaugler 1993, Lewis 2002). La larva del picudo de la guayaba es inmóvil y permanece

en el suelo por largos periodos de tiempo (60-90 días), por lo que presentar forrajeo tipo “cruceiro” por parte del nematodo entomopatígeno, es más efectiva para encontrar este hospedero.

Aunque las dos especies de nematodos evaluadas tienen estrategia de forrajeo tipo “cruceiro”, es *Heterorhabditis* sp. SL0708 la que genera mayor porcentaje de mortalidad para *C. psidii*. Se ha registrado que los nematodos entomopatígenos presentan quimiorreceptores, con los cuales se orientan hacia su hospedero depende de sus liberaciones de CO<sub>2</sub>, de otros olores como ácido láctico, heces, entre otros (Kaya y Gaugler 1993), y ese reconocimiento por un determinado hospedero, va a afectar su desplazamiento y su eficacia, principalmente en los “cruceiro”, ya que les confiere un mayor potencial para encontrarlo (Lewis 2002). La mayor mortalidad registrada por *Heterorhabditis* sp. SL0708 indica que su capacidad para reconocer *C. psidii* es mayor que *Steinernema* sp.1 JCL024.

Las pruebas de las columnas de arena se realizaron con sustrato del área de estudio, el cual presentó materia orgánica, con mayor cantidad de arena (52%) que de arcilla, donde la arena genera porosidad en el sustrato. La porosidad es un factor importante para los JIs dado que cuando los poros del suelo son más pequeños (poca arcilla), la movilidad de los JIs decrece; también se reducen los niveles de oxígeno disponibles para los JIs, disminuyen así su capacidad de supervivencia y de percibir las señales del hospedero (Koppenhofer y Fuzi 2006, Lewis 2002, Sáenz y Olivares 2008). Adicionalmente, las prácticas culturales en la agricultura, incluyendo la aplicación de fertilizantes y plaguicidas también pueden afectar negativamente el comportamiento de los nematodos (Lewis 2002), por lo que la carencia de estos dos tipos de prácticas en el área guayabera santandereana y el tipo de suelo, favorece la aplicación de los nematodos entomopatígenos.

## 7.2 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de invernadero.

Los nematodos entomopatígenos aplicados como cadáveres infectados es una alternativa que cobra mayor importancia cuando se identifica la distribución de las poblaciones plaga, como por ejemplo el picudo de la guayaba que se localiza en el plato de los árboles. Entre otras ventajas de la aplicación de cadáveres infectados se encuentra



la reducción de la fase de almacenamiento, ya que cuando *Heterorhabditis* sp. SL0708 es almacenado a 25°C durante dos meses, la viabilidad se reduce en un 30% y a un 100% a los cuatro meses (Mejía y Sáenz 2013), para *S. colombiense* a 10°C durante tres meses, la reducción de la viabilidad es de 53%, y del 98% para *H. bacteriophora* (Realpe-Arada *et al.* 2007).

Los cadáveres infectados se aplicaron después de 14 días de realizada la infección con el nematodo entomopatógeno y la primera evaluación de mortalidad se realizó a los ocho días de su aplicación, lo cual permite la emergencia de los JI de los cadáveres de *G. mellonella* (15-20 días), la búsqueda, la infección y el desarrollo de los síntomas por parte del nematodo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Sáenz y López 2011). En el presente estudio, los JIs recién emergidos de las larvas tenían de siete a dos días para dejar el cadáver, buscar al hospedero, penetrar y matar las larvas de picudo de la guayaba, donde la mayor emergencia de JI a partir de *G. mellonella* se presenta en el quinto día (Sáenz y López 2011).

En los ensayos de invernadero se presentan claras diferencias entre las dos especies de nematodos entomopatógenos evaluadas. *Heterorhabditis* sp. SL0708 muestra una mayor capacidad de desplazarse, buscar y matar al picudo de la guayaba bajo condiciones que son más parecidas a las de la región guayabera colombiana. Del Valle *et al.* (2008) en ensayos de invernadero reportaron porcentajes de mortalidad menor a los del presente estudio (menor al 71%), ellos evaluaron *Heterorhabditis baujardi* LPP7 para *C. psidii* con cadáveres infectados, con valores menores al 51%, ellos atribuyen los resultados al poco tiempo entre la emergencia de los JI y el tiempo de evaluación; sin embargo, ellos seleccionaron ésta especie de nematodo por su tolerancia a altas temperaturas en el suelo (>30°C), por lo que esas condiciones pueden afectar tanto la emergencia como su capacidad virulenta. Para Del Valle *et al.* (2008) no se presentaron diferencias cuando se aplicaron 2, 4 y 6 cadáveres infectados y la aplicación de un cadáver no presentó diferencias con el control, mientras que en el presente estudio, todos los tratamientos fueron diferentes al control, pero la aplicación de 4 y 6 cadáveres fue superior a los otros dos tratamientos.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio en la fase de laboratorio e invernadero, se espera que *Heterorhabditis* sp. SL0708 aislado en Colombia en un área con características similares a región guayabera santandereana, pueda ser efectivo para

el control biológico de *C. psidii*, aplicados mediante la técnica de cadáveres infectados. Lo anterior teniendo en cuenta que en el sitio de estudio no se registraron muestras positivas en la búsqueda de nematodos entomopatógenos, como éstos organismos se distribuyen en conglomerados, puede que no se presenten en las áreas donde se realizaron las parcelas experimentales, aunque si se pueda encontrar en la región. Adicionalmente, su ausencia puede deberse a que los nematodos entomopatógenos son difíciles de aislar en sistemas agrícolas, a que pueden variar con el tiempo ó a la baja representatividad de las muestras (Hominick 2002).

El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. SL0708 además de los resultados que se registraron para el control del picudo de la guayaba, posee una serie de características biológicas y ecológicas que lo convierten en un agente de control biológico potencial para ser implementado en programas de manejo integrado de plagas. Los heterorhabditidos poseen un ciclo de vida con generaciones hermafroditas y anfimícticas que ocurren dentro del hospedero, se encuentra asociado con la bacteria simbiote del género *Photorhabdus*, para el cual todas sus especies se han reportado como altamente entomopatógenas. Entre otras ventajas que presentan las especies de éste género de nematodos, es que sus JIs ingresan al huésped por aberturas naturales ó por las membranas intertegumentales dado que los JIs poseen un diente en la parte anterior, adicionalmente, los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708 retienen la cutícula del estado anterior, lo que les confiere mejor respuesta a las condiciones externas (Burnell y Stock 2000, Grewal 2002, Sáenz y López 2011).

### 7.3 Pruebas de virulencia de los JI en condiciones de campo.

En las pruebas de campo, *Heterorhabditis* sp. SL0708 causó elevados valores de control (84-91% mortalidad corregida) sobre las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba, bajo condiciones naturales. Se esperaba un porcentaje de mortalidad menor a partir de los resultados obtenidos en la fase de invernadero. Del Valle *et al.* (2008) registraron elevadas mortalidades para *C. psidii* en ensayos de campo en los tratamientos de 2, 4 y 6 cadáveres aplicados (90-95%), donde la mayor dosis (6 cadáveres) fue la que estadísticamente presentó diferencias con el control, en el presente trabajo la aplicación de 4 y 6 cadáveres fueron las que presentaron esa diferencia. Del Valle *et al.* atribuyeron la elevada mortalidad a causas naturales, ya que el tratamiento control presentó una mortalidad del 81%, ellos registraron la mortalidad como la ausencia de cadáveres de *C.*

*psidii*, mientras que en el presente estudio se encontraron la mayoría de larvas con los signos típicos de una infección por nematodos entomopatógenos, garantizando que la mortalidad se debió en gran parte a los nematodos.

En invernadero y campo el porcentaje de mortalidad de las larvas de *C. psidii* en las parcelas sin tratamiento fue menor al 32% a lo largo del estudio. Éstos valores de mortalidad son correspondiente al rango previamente registrado para los valores de supervivencia de cuarto estadio larval a adulto (80%) en condiciones de laboratorio (Bailez *et al.* 2003). La mortalidad en los tratamientos testigo puede deberse a la presencia de enemigos naturales, ya que la mortalidad aumentó en el tiempo de evaluación. También puede deberse a la tendencia de las larvas de diferentes especies del género *Conotrachelus* de ser frágiles y propensas a la mortalidad natural (Shapiro-Ilan *et al.* 2002).

Durante las pruebas de campo se presentó una elevada humedad, lo que podría favorecer tanto la emergencia de los JIs, como su desplazamiento, búsqueda e infección de las larvas del picudo de la guayaba, como se ha registrado en otros estudios (Alekseev *et al.* 2006, Gruner *et al.* 2007, Pérez *et al.* 2003). En las pruebas de dispersión, se demostró que los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708 tienen la capacidad de desplazarse tanto vertical como horizontalmente hasta la onceava semana en condiciones naturales, lo cual cubriría el área de la parcela experimental, la profundidad en la que se encuentran las larvas y el tiempo de evaluación, garantizando que se presente un contacto entre el patógeno y el huésped en los ensayos de campo.

### **7.3.1 Dispersión de *Heterorhabditis* sp. SL0708 aplicados en suelo como cadáveres infectados en campo.**

En las pruebas de dispersión de los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708, no se observa una diferencia significativa en el desplazamiento horizontal (30 con 120 cm), por lo que se propone 120 cm como la distancia a ser adoptada entre los sitios de aplicación; teniendo en cuenta que el plato de los árboles es de alrededor de 4m, se requerirían al menos tres puntos de aplicación de cadáveres infectados para cubrir el área. Respecto a la profundidad, no se presentan diferencias entre 0-10 y 10-20 cm, la mayor proporción de JI en éstos niveles favorece el control del picudo de la guayaba, dado que la larva se desplaza en éstas profundidades. Aunque los JIs se encuentran expuestos a diversas condiciones en la primera capa del suelo, los JIs de *Heterorhabditis* sp. SL0708

conservan la cutícula del estadio anterior que le confiere una mejor adaptación a las condiciones adversas (Sáenz y López 2011).

El mayor número de JI recuperados a partir de la aplicación de 15 cadáveres infectados con *Heterorhabditis* sp. SL0708 fue en la primera semana (130 JI), con un decline hasta la semana 11, en la que se registraron muy pocos JIs. Esto difiere con lo registrado por Del Valle *et al.* (2008), quienes encontraron el mayor número de JI (5 JI) en la quinta semana de evaluación, con muy pocos (menos de 1 JI) en las anteriores y siguientes evaluaciones. Los valores de JI recuperados en el presente estudio se pueden deber a la elevada humedad del suelo dado que se presentaron precipitaciones abundantes durante todo el periodo de evaluación y a la baja temperatura registrada. La alta humedad en el suelo facilita el desplazamiento tanto vertical como horizontal de los JI, dado que los nematodos necesitan una película de agua para una propulsión efectiva (Alekseev *et al.* 2006, Grant y Villani 2003, Koppenhofer y Fuzy 2007). Del Valle *et al.* (2008) registraron mayor desplazamiento de JI a partir de cadáveres infectados cuando se presentan precipitaciones. Para *Heterorhabditis* sp. SL0708 en una humedad del 100% del suelo, se han reportado los mayores valores de viabilidad y producción (Mejía y Sáenz 2013). La infección del cadáver completaba 14 días cuando se aplicó, por lo que al encontrar las condiciones apropiadas en la superficie del suelo, inició desde el primer día la emergencia de los JI y continuaron su emergencia los días posteriores, hasta su agotamiento.

### 7.3.2 Persistencia de los JIs bajo condiciones de campo.

Las pruebas de persistencia de los JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708 se realizaron a partir las parcelas de virulencia en campo, donde se aplicaron tanto cadáveres infectados como larvas de *C. psidii*. Los JIs presentaron infectividad hasta la semana número doce, la cual decrece con el tiempo, pero es en la octava semana donde se observó una disminución considerable de la infectividad de los JI. Dado que en las pruebas de dispersión se registró un elevado número de JIs hasta la semana tres, los resultados obtenidos hasta la octava semana se debe a la presencia de un insecto hospedero que permitió su multiplicación. Adicionalmente, en las pruebas de persistencia no se registraron diferencias entre el número de cadáveres aplicados y la infectividad en el tiempo. A partir de lo anterior, se puede decir que la persistencia de los JI no está relacionada con el número de JI aplicados, sino con características intrínsecas de los nematodos como la presencia y cantidad de la reserva de lípidos (Kaya y Gaugler 1993, Wilson *et al.* 2003,

Wilson y Gaugler 2004); características ambientales como humedad, temperatura y textura del suelo (Koppenhofer *et al.* 1995, Koppenhofer y Fuzy 2007), de características bióticas como enemigos naturales (Kaya 2002), y a la presencia de un hospedero que permita su multiplicación.

Las observaciones indican que la época de aplicación de nematodos (basados en el ciclo de vida de la plaga y las condiciones ambientales) es crítico para obtener altos niveles de control de *C. psidii*, dado que los mayores valores se presentan en las primeras semanas de aplicación de los cadáveres. En el presente estudio se encontró que *Heterorhabditis* sp. SL0708 fue infectivo durante un tiempo representativo para hacer un control biológico efectivo, como lo afirman Shapiro *et al.* (2006), quienes indican que los JI deben ser capaces de permanecer en el suelo por al menos dos semanas después de la aplicación para que el control sea significativo.

Debido a la biología de *C. psidii*, a su rápido aumento poblacional y a las características del cultivo de la guayaba en Santander, incorporar el control del cuarto estadio larval con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. SL0708 dentro de una estrategia de manejo integrado de plagas, se presenta como un panorama desafiante. Aunque el daño en el fruto es causado por los primeros estadios larvales, el control con nematodos entomopatógenos aplicados a partir de cadáveres infectados son tecnologías de fácil aplicabilidad por parte de los agricultores, con lo cual se podría obtener a futuro una disminución del tamaño poblacional del picudo de la guayaba en la región.

## 8. Conclusiones

De las siete especies de nematodos entomopatógenos evaluadas entre Heterorhabditidae y Sterneimatidae, la que presentó mayor porcentaje de mortalidad en laboratorio, invernadero y campo sobre las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba fue *Heterorhabditis* sp. SL0708.

Aplicar *Heterorhabditis* sp. SL0708 mediante cadáveres infectados para el control de *C. psidii*, en 3 puntos por plato del árbol de guayaba, cada uno con 4 cadáveres; con dos aplicaciones al año.

---

## 9.Recomendaciones

A partir de los resultados de control que presentó *Heterorhabditis* sp. SL0708 en campo sobre las larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba, así como de su persistencia en un tiempo de doce semanas, se recomienda evaluar el control residual en el siguiente periodo de emergencia de las larvas de *C. psidii* (octubre-noviembre 2012).

En el presente estudio se reportan para el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. SL0708 controles en campo para el picudo de la guayaba de hasta el 90%, por lo cual se recomienda su aplicación en toda la región, mediante la técnica del cadáver infectado, en una proporción de tres puntos de aplicación (cuatro cadáveres) por plato del árbol de guayaba, cada tres meses.

Los productores guayaberos deben implementar la producción *in vitro* de larvas de *G. mellonella* para las aplicaciones de los cadáveres infectados con *Heterorhabditis* sp. SL0708, de acuerdo al ciclo de vida del picudo.

Conocer el estado actual de la plaga, tanto de abundancia, distribución como de pérdidas económicas que se presentan en la región guayabera santandereana con el objeto de dirigir las prácticas de manejo integrado del picudo.

Se recomienda realizar una búsqueda más extensiva en la región en diferentes tiempos, de nematodos entomopatógenos y de otros enemigos naturales que puedan ser implementados en un manejo integrado del picudo de la guayaba.

## 10. Bibliografía

ADAMS, B.J., NGUYEN, K.B. 2002. Taxonomy and sistematyics. In: Gaugler, R. (Ed). Entomopathogenic nematology. CABI Publishing Series. Pp. 1-29.

ALEKSEEV, E., GLAZER, I., SAMISH, M. 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. Biocontrol. 51(4): 507-518.

ALOMAR, O., ALBAJES, R. 2005. Control Biológico de Plagas, Biodiversidad Funcional y gestión del Agrosistema, Barcelona-España. Biojournal.net. Nº 1. Pp. 10.

ANÓNIMO. 2012. Sitio oficial de Guavatá en Santander, Colombia. [www.guavata-santander.gov.co](http://www.guavata-santander.gov.co)

BAILEZ, O.E., VIANA-BAILEZ, A.M., LIMA, J.O., MOREIRA, D.O. 2003. Life-History of The Guava Weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). Neotropical Entomology. April-June: 203-207.

BOSCÁN DE MARTÍNEZ, N., CÁSAIRES, R. 1980. El gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* 1. Evaluación de daños. Agronomía tropical. 30(1-6): 77-83.

BOSCÁN DE MARTÍNEZ, N., CÁSAIRES, R. 1981. Distribución en el tiempo de las fases del gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* en el campo. Agronomía tropical. 31(1-6): 123-130.

BRITO, E., RODRIGRUEZ DE PAULA, A., PEREIRA, L., DOLINSKI, C., SAMUELS, R. 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). Biocontrol Science and Technology. 18(7): 665-673.



- BURNELL, A. M., STOCK, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. *Nematology*. 2(1): 31-42
- CHACÓN, A., CUENCA, G. 1998. Efecto de las micorrizas arbusculares y de la fertilización con fósforo, sobre el crecimiento de la guayaba en condiciones de vivero. *Agronomía Tropical*. 48(4): 425-440.
- CORDERO, J., BOSHIER, D., BARRANCE, A., BEER, J., CHAMBERLAIN, J., DETLEFSEN, G., FINEGAN, B., GALLOWAY, G., GÓMEZ, M., GORDON, J., HANDS, M., HELLIN, J., HUGHES, C., IBRAHIM, M., LEAKEY, R., MESÉN, F., MONTERO, M., RIVAS, C., SOMARRIBA, E., STEWART, J. 2003. Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. OFI-CATIE. Pp.1080.
- DEL VALLE, E., DOLINSKI, C., SOUZA, R., SAMUELS, R. 2005. Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (28) (Nematoda: Rhabditida) seleccionada para tolerancia a elevadas no controle de *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae). *Nematología Brasileira*. 29: 199-205.
- DEL VALLE, E., DOLINSKI, C., BARRETO, E., SOUZA, R., SAMUELS, R. 2008. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) Applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Insect Cadaversto *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) Larvae. *Biocontrol. Science and Technology*. 18: 33-41.
- DOLINSKI, C., LANCELY, L. 2007. Microbial Control of Arthropod Pests of Tropical Tree Fruits. *Neotropical Entomology*. 36(2): 161-179.
- DOLINSKI, C., DEL VALLE, E.E., STUART, R.J. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological control*. 38: 422-427.
- DOLINSKI, C., DEL VALLE, E.E., BURLA, R.S., MACHADO, I.R. 2007. Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira*. 31: 54-59.
- DOLINSKI, C. 2009. Controle biológico com “Nematóides do bem”. *Frutas e derivados*. 12(4): 41-47.

FAN, X., HOMINICK, W.M. 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. *Review Nematology*. 14: 381-387.

FEDERICI, B. 1999. A perspective on pathogens as biological control agents for insect pest. In: Bellows, T., Fisher, T. (Eds). *Handbook of biological control: principles and applications of biological control*. Academic Press. Pp. 517-547.

GRANT, J., VILLANI, M.G. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental entomology*. 32(1): 80-87.

GREWAL, P.S., EHLERS, R.U., SHAPIRO-ILAN, D.I. 2005. *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing. New York. Pp. 505.

GREWAL, P. 2002. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (Ed), *Entomopathogenic nematology*. CABI international. 265-286.

HAZIR, S., KAYA, H. K., STOCK, P., KESKIN, N. 2004. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*. 26: 181-202.

HERNÁNDEZ, E., PINZÓN, G. 2011. Productores de guayaba en Puente Nacional-Santander. *Comunicación Personal*.

HOMINICK, W.M. 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing. New York. Pp. 115–143.

INSUASTY, O., MONROY, R., DIAZ, A., BAUTISTA, J. 2007. Manejo integrado del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall en Santander. Corpoica, Ica, Secretaria de Agricultura y desarrollo de Santander. Pp 27.

INSUASTY, O., MONROY, R., DIAZ, A., BAUTISTA, J. 2011. Manejo fitosanitario del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santander. Corpoica- ICA Imprenta nacional de Colombia. Pp. 40.

KAYA, H.K., GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38: 181–206.

KAYA, H.K., STOCK, P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, CA. Academic Press. Pp. 281-324.

- KAYA, H.K. 2002. Natural enemies and other antagonist. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. New York. Pp. 189–203.
- KLEIN, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press. Boca Raton FL. Pp. 195-214.
- KOPPENHOFER, A., KAYA, H.K., TAORMINO, S. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 65: 193-199.
- KOPPENHOFER, A., BAUR, M., STOCK, S., YUL, H., CHINNASRI, B., KAYA, H. K. 1997. Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. *Applied Soil Ecology*. 6: 231-240.
- KOPPENHOFER, A.M., FUZY, E.M. 2007. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the EN *S. scarabaei*, *S. glaseri*, *H. zealandica* and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*. 35: 128-139.
- LEITE, L.G., TAVARES, F.M., GOULART, R.M., BATISTA, A., PARRA, J.R. 2005. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a larvas de 6º instar do bicho-furão, *Ecdytolopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae), e avaliação de dosagens de *Heterorhabditis indica* na mortalidade do inseto. *Revista Agrícola*. 80: 316-330.
- LEWIS, E.E. 2002. Behavioural ecology. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. New York. Pp. 205- 221.
- LOZANO, C., TORO, J., GARCÍA, J., TAFUR, R. 2002. Manual sobre el cultivo de la guayaba en Colombia. *Fruticultura Colombiana*. Lavalley Ltda. Pp. 278.
- MEJÍA, M.C., SÁENZ, A. 2013. Ecological characterization of the Colombian entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. SL0708. *Brazilian Journal of Biology*.
- MERINO, L., FRANCE, A. 2009. Nematodos Entomopatógenos: Control Biológico de Insectos Plaga de Importancia Económica. *Revista Tierra Adentro*, INIA, Chile. 84: 24-25.
- MOLINA, J.P., LÓPEZ, J.C. 2001. Producción *in vivo* de tres entomonemátodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología*. 27(1-2): 73-78.

- MONROY, E., INSUASTY, O. 2006. Aspectos biológicos y duración de los estadios del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii*. Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 7(2): 73-79.
- MORALES, A., MELGAREJO, L. 2010. Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava*L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva. Universidad Nacional de Colombia. Panamericana formas e impresos S.A. Pp.198.
- MORTON, A., GARCIA-del-PINO, F. 2010. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. Journal of Invertebrate Pathology. 28(1): 185-207.
- NICHOLS-ESTRADA, C.I. 2008. Control Biológico de Insectos: Un enfoque agroecológico, Medellín Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Pp. 282.
- PÉREZ, E.E., LEWIS, E.E., SHAPIRO-ILAN, D.I. 2003. Impact of the host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. Journal of Invertebrate Pathology. 82(2): 111-118.
- PERALES, M., PADILLA, J., GONZALEZ, E., REYES, H. 2005. Manual para la producción integral de la guayaba. Consejo nacional mexicano de la guayaba. Fundación produce Aguas Calientes. Pp.179.
- RAGA, A., SOUZA, M., PRESTES, D., AZEVEDO, J., SATO, M. 2006. Susceptibility of guava genotypes to natural Infestation by *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the municipality of Monte Alegre do Sul, state of São Paulo, Brazil. Neotropical Entomology. 35(1): 121-125.
- REALPE-ARANDA, F.J., BUSTILLO-PARDEY, A.E., LÓPEZ-NÚÑEZ, J.C. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Cenicafé. 58(2): 142-157.
- SÁENZ, A., LUQUE, J. 2000. Cultivo *in vivo* y método de almacenamiento para juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae). Agronomía Colombiana 17(1-3): 37 - 45.

SÁENZ, A. 2005. Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*. 26(2): 41-57.

SÁENZ, A.A., OLIVARES, W. 2008. Capacidad de búsqueda de *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterygidae). *Revista Colombiana de entomología*. 34(1): 51-56.

SÁENZ, A.A., LÓPEZ, J.C. 2011. Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 37(1): 43-47.

SAYERS, E.W., BARRETT, T., BENSON, D.A., BOLTON, E., BRYANT, S.H. 2009. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D5-15.

SHAPIRO, D. I., GLAZER, I. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected host versus aqueous suspension. *Biological control*. 25: 1455-1461.

SHAPIRO, D. I., LEWIS, E. 1999. Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected host versus aqueous suspension. *Biological control*. 28: 907-911.

SHAPIRO-ILAN, D.I. 2001. Virulence of entomopathogenic nematodes to pecan weevil larvae, *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), in the Laboratory. *Biological and microbial control*. 94(1): 7-13.

SHAPIRO-ILAN, D.I., MIZELL, R., CAMPBELL, J.F. 2002. Susceptibility of the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* to entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*. 34(3): 246-249.

SHAPIRO-ILAN, D.I., LEWIS, E.E., TEDDERS, W.L. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83: 270-272.

SHAPIRO-ILAN, D.I., MIZELL, R.F., COTTRELL, T.E., HORTON, D.L. 2004. Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae* and *Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, larvae. *Biological Control*. 30: 496-503.

- SHAPIRO-ILAN, D.I., GOUGE, D.H., PIGGOTT, S.J., PATTERSON, J. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Comparative and General Pharmacology*. 38: 124-133.
- SHAPIRO-ILAN, D., RUSSELL, F., MIZELL I., COTTRELL, T., HORTON, D. 2008. Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: Effects of application timing, alternate host plant, and nematode strain. *Biological Control*. 44: 207-215.
- SOUZA, E., RODRIGUES, A., PEREIRA L., DOLINSKI, C., SAMUELS, I. 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae ). *Biocontrol Science*. 18(7): 665-674.
- STOCK, P. 1998. Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional de Litoral. Santa Fé- Argentina. Pp.
- STRONG, D.R., KAYA, H.K., WHIPPLE, A.V., CHILD, A.L, KRAIG, S., BONDONNO, M., DYER, K., MARON J.L. 1996. Entomopathogenic nematodes: natural enemies of root-feeding caterpillars on bush lupine. *Oecologia (Berlin)*. 108(1): 167-173.
- THOMAS, S.R., ELKINTON, J.S. 2004. Pathogenicity and virulence. *Journal of invertebrate pathology*. 85: 146-151.
- WILSON, M.J., LEWIS, E.E., YODER, F., GAUGLER, R. 2003. Application pattern and persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*. 26: 180-188.
- WILSON, M., GAUGLER, R. 2004. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. *Journal Entomology*. 128(4): 250-253.