



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACÁDEMICO DE BIOLOGÍA



**Determinación CL50 de *Heterorhabditis* sp. y
H. bacteriophora para el control biológico de larvas del III
estadio de *Spodoptera frugiperda* en cultivo de *Zea mays*.
Invernadero – INIA, Lambayeque.**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. Junnior Alexander Sánchez jara

Br. Jorge Anibal Valle Delgado

LAMBAYEQUE, PERÚ

2018

**Determinación CL50 de *Heterorhabditis* sp. y *H. bacteriophora*
para el control biológico de larvas del III estadio de *Spodoptera*
frugiperda en cultivo de *Zea mays*. Invernadero – INIA,
Lambayeque.**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – BIOLOGÍA

APROBADO POR:

Dr. César Estela Campos

PRESIDENTE

Lic. Jorge Luis Chanamé Céspedes

SECRETARIO

Dr. Luis Edmundo Chicoma Chaqui

VOCAL

Dra. Carmen Patricia Calderón Arias

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primera instancia a Dios por brindarnos salud.

Agradecemos especialmente al instituto Nacional de innovación Agraria (INIA), EEA Vista florida, por brindarnos sus instalaciones para el desarrollo de nuestra tesis y al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) por el financiamiento de la presente.

A nuestra asesora la Dra. Carmen Calderón Arias quien se comprometió con nosotros para el desarrollo de la tesis y poder concluir de manera satisfactoria.

Un agradecimiento sincero para nuestros Coasesores la Ing. Marielena Neira y el Blgo. Darwin Pérez por brindarnos el tiempo y orientación para realizar los avances de nuestra Tesis.

Especial reconocimiento a nuestro amigo y profesor MSc. Jorge Fupuy por permitirse orientarnos en los resultados de nuestro proyecto, y a nuestras amigas y colegas Blga. Diana y Br. Thalía que nos brindaron su apoyo de manera desinteresada.

Y el merecido agradecimiento al personal técnico del área de controladores Biológicos del Instituto por el apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mis padres:

Elciro Sánchez y Flor Jara. Que gracias a sus consejos de aliento me han ayudado a crecer como persona y a luchar por seguir adelante, gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar esta gran meta. Los quiero mucho.

A mis hermanos:

Gracias por su apoyo, por estar en los momentos más importantes de mi vida. Este logro también es para ustedes.

A ti

Mi amor Zuzetthy. Gracias por estar a mi lado, por tu apoyo, comprensión y confianza que me has dado siempre, por incentivarme en todo momento para ser mejor cada día.

A mis amigos:

Jorge, Joseph y Percy a quienes los considero como mi segunda familia. Hermanos gracias por los gratos momentos pasados en nuestra vida universitaria.

JUNNIOR ALEXANDER SÁNCHEZ JARA

DEDICATORIA

A mi compañero y amigo; que me protege siempre desde el basto cielo,
mi Padre, Jorge Anibal Valle Banda.

A mi madre Ofelia Delgado Rufasto por ser un ejemplo de vida, por
brindarme ese amor incondicional que jamás perecerá, porque gracias a
ella pude formarme como profesional y puedo decir que
la vida no me alcanzaría para agradeceréselo
Te amo madre mía.

A mi hermana Elva Valle Delgado por ser la perla de nuestra familia y por
regalarme la mejor infancia, juegos, risas, llantos y alegrías que jamás
cambiaría por nada.
Te amo hermana querida.

A la Srta. Olga Z. y familia, por brindarme su apoyo incondicional, para
seguir creciendo profesionalmente.

A mis hermanos de otra sangre Joseph, Alexander y Percy amigos
sinceros, que aunque por azares del destino nos separemos,
siempre perdurarán en mi memoria.

JORGE ANIBAL VALLE DELGADO

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de investigaciones	3
2.2. Base teórica.....	6
2.2.1. Género: Heterorhabditis.....	6
2.2.2. Spodoptera frugiperda. “Gusano cogollero”	9
2.2.3. Cultivo de maíz (Zea mays)	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Materiales	13
3.1.1. Material biológico	13
3.1.2. Población y muestra	13
3.2. Métodos	13
3.2.1. Variables de la investigación	13
3.2.2. Diseño experimental	14
3.2.3. Localización de la investigación.....	14
3.2.4. Cronología de la investigación	14
3.2.5. Acondicionamiento para la siembra de maíz en invernadero	18
3.2.6. Crianza de Spodoptera frugiperda en Laboratorio	22
3.2.7. Crianza de Nemátodos Entomopatógenos	26
3.2.8. Aplicación de los tratamientos	28
3.2.9. Evaluaciones	34
3.2.10. Análisis estadístico	37
IV. RESULTADOS	38
4.1. Porcentaje de daño en plantas a las 48 horas.....	38
4.2. Evaluación de la mortalidad por presencia de los infectivos juveniles en las concentraciones	40
4.3. Porcentaje de mortalidad de las larvas de cogollero a las 48 horas	45
4.4. Determinación de la Concentración Letal Media (CL50)	49

V. DISCUSIÓN.....	52
VI. CONCLUSIONES.....	57
VII. RECOMENDACIONES.....	58
VIII.RESUMEN.....	59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
X. ANEXOS.....	67

Índice de tablas

Tabla 1 Cantidad total de infectivos juveniles (Ijs) requerido para cada concentración de los tratamientos.....	29
Tabla 2 Volumen total (ml) de la solución de infectivos juveniles (Ijs), calculados según fórmula para cada Repetición.....	30
Tabla 3 Carta de Volúmenes finales (ml) para el tratamiento con <i>H. sp.</i>	31
Tabla 4 Carta de volúmenes finales (ml) para el tratamiento con <i>H. bacteriophora</i>	31
Tabla 5 Temperatura promedio en el Invernadero del área de Forestales de INIA (EEA - VF).....	32
Tabla 6 Registro de Daño en Plantas de Maíz por las Larvas de Cogollero después de Aplicar los Tratamientos	35
Tabla 7 Registro de Mortalidad de las Larvas de Cogollero después de Aplicar los Tratamientos.....	35
Tabla 8 Porcentaje de Mortalidad de las Larvas de Cogollero de los Tratamientos con <i>H. bacteriophora</i> y <i>H. sp.</i>	45
Tabla 9 Prueba HSD Tukey del Promedio de Larvas Muertas del Tratamiento con <i>H. bacteriophora</i>	46
Tabla 10 Prueba HSD Tukey del Promedio de Larvas Muertas, a las 48 horas de la Aplicación del Tratamiento con <i>H. sp.</i>	46
Tabla 11 Prueba de Comparación simultánea de Tukey de los Tratamientos con <i>H. bacteriophora</i> y <i>H. sp.</i>	47
Tabla 12 Carta de Prueba CL50 con el Tratamiento de <i>H. bacteriophora</i>	49
Tabla 13 Carta de prueba CL50 con el tratamiento de <i>H. sp.</i>	50

Índice de figuras

Fig. 1 Diseño de estímulo creciente para determinar la Concentración Letal Media a las 48 horas (CL50-48) de los tratamientos con <i>H. sp.</i> , y <i>H. bacteriophora</i>	15
Fig. 2 Mapa de ubicación del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), EEA – Vista Florida, Lambayeque, 2017.....	16
Fig. 3 Línea de tiempo para el desarrollo del proyecto: Determinación CL50 de nemátodos entomopatógenos <i>H. bacteriophora</i> y <i>H. sp.</i>	17
Fig. 4 Ubicación de la zona de cultivo del sector 1-1 de INIA (EEA – vista florida), Lambayeque, 2017.....	18
Fig. 5 Proceso de extracción, desinfección y acondicionamiento. Extracción de tierra de las zonas de cultivo, sector 1-1 de INIA (EEA - Vista Florida) (A, B). Preparación de solución de formol (C, D). Proceso de desinfección de tierra del área de forestales de inia (EEA – Vista Florida), aplicación y remoción de solución de formol en la tierra (E). Llenado de macetas y acondicionamiento en invernadero (F, G).	19
Fig. 6 Siembra de las semillas de maíz amarillo duro (A). Etiquetado de carteles para identificar los tratamientos en el invernadero del área de forestales de inia (EEA – Vista Florida) (B)	21
Fig. 7 Germinación de plantas de maíz (4 días después de la siembra de las semillas de maíz amarillo duro (A). Fertilización de la tierra después de 5 días de la germinación de maíz amarillo duro en el invernadero del área de forestales de inia (EEA – Vista Florida). (B).....	21
Fig. 8 Ubicación de la zona de cultivo del distrito de Reque, Lambayeque, 2017 (A). Campo de cultivo – Distrito de Reque. (B).....	22
Fig. 9 Posturas de cogollero colectadas de la zona de cultivo del distrito de Reque, Lambayeque (A). Recipientes acondicionados con larvas en estadio larval I1 (B). Tapers acondicionados con higuierilla para larvas en estadio L3 a L6 (C). Acondicionamiento de pupas en aserrín desinfectado (D). Tapers acondicionados con mariposas de <i>G. mellonella</i> (E). Posturas ovopositadas en malla de la crianza en laboratorio (F).	25
Fig. 10 tapers con larvas de <i>Galleria mellonella</i> seleccionadas para la parasitación (A). Aplicación de solución de nemátodos entomopatógenos a las larvas de <i>G. mellonella</i> (B). Parasitación efectiva a las 72 horas con los nematodos: <i>H. sp</i> (C) y <i>H. bacteriophora</i> (D). Acondicionamiento de cámara	

húmeda de las larvas parasitadas con nematodos (E). Cosecha y recuperación de infectivos juveniles de los nemátodos entomopatógenos (F). 27

Fig. 11 Infestación de larvas de cogollero en estadio L3 en las plantas de maíz. Tapers con larvas de cogollero L3 seleccionadas (A). larva de cogollero dentro del cogollo del maíz (B). 28

Fig. 12 Método de aplicación de los tratamientos. Aplicación con la solución final de *H. bacteriophora* (A). Aplicación con la solución final de *H. sp* (B). 33

Fig. 13 Muestra de larvas de cogollero muertas, recolectadas a las primeras 24 a 48 horas después de la aplicación de los tratamientos 36

Fig. 14 Porcentaje de la cantidad de plantas registradas con daño, a las 48 horas de la aplicación de los tratamientos 38

Fig. 15 Muestra de los vestigios de daño en plantas, ocasionado por larvas de cogollero en estadio L3, después de la aplicación de los tratamientos. (A, B, C, D) 39

Fig. 16 Parasitación efectiva de las larvas de cogollero visualizadas en estereoscopio, a las 24 y 48 horas de aplicado los tratamientos. (A) Parasitación efectiva con el tratamiento de *Heterorhabditis sp*. (B) Parasitación efectiva con el tratamiento de *H. bacteriophora*. 40

Fig. 17 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 750 ijs por larva de cogollero. 41

Fig. 18 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 500 ijs por larva de cogollero. 41

Fig. 19 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 300 ijs por larva de cogollero. 42

Fig. 20 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 200 ijs por larva de cogollero. 42

Fig. 21 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 750 ijs por larva de cogollero. 43

Fig. 22 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 500 ijs por larva de cogollero 43

Fig. 23 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 300 ijs por larva de cogollero 44

Fig. 24 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de <i>H. sp.</i> , en una concentración de 200 ijs por larva de cogollero	44
Fig. 25 Media de la cantidad de larvas muertas a las 48 horas después de la aplicación de los tratamientos	45
Fig. 26 Variación de la cantidad de larvas muertas de cogollero que se registró en cada repetición de los tratamientos (<i>H. bacteriophora</i> y <i>H. sp.</i>).....	48
Fig. 27 Variación de la prueba de CL50-48 durante los ensayos, para el tratamiento con <i>H. bacteriophora</i>	49
Fig. 28 Variación de la prueba de CL50-48 durante los ensayos, para el tratamiento con <i>H. sp.</i>	50
Fig. 29 Comparación general del resultado de CL50-48 de los tratamientos con <i>H. bacteriophora</i> y <i>H. sp.</i>	51
Fig. 30 Esquema general de la disposición de las macetas en el invernadero del área de forestales del inia (EEA – Vista Florida)	68
Fig. 31 Preparación de la solución de Agar al 0,1%. Esterilización de agua en autoclave (A). Estimación de peso en gramos de Agar Nutriente (B). Obtención de solución de Agar Nutriente al 0,1% (C).	68
Fig. 32 Resultado de ph de la solución de Agar Nutriente al 0,1%.	68

I. INTRODUCCIÓN

El maíz amarillo duro es uno de los cultivos más importantes del Perú, se siembra mayormente en la costa y la selva; siendo Lambayeque, La Libertad, Áncash, Lima y San Martín los principales departamentos productores, que en conjunto; representan el 55% de área cultivada (Injante & Joyo, 2010).

En este cultivo, una de las principales plagas es el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*); la cual se considera endémica, es decir siempre existen poblaciones que causan daño en mayor o menor proporción al cultivo (Zenner de Polonia *et al.*, 2006). El daño económico de esta plaga generalmente es importante. Una infestación no controlada de *S. frugiperda* puede ocasionar una reducción del rendimiento de 13 a 60%, debido a la pérdida de área foliar y a un retraso o inhibición en la emisión de las inflorescencias (García N. & Tarango R., 2009).

En la agricultura moderna son mayores los beneficios económicos que con frecuencia sustentan el uso de plaguicidas; esto sin tener en cuenta los desastres ecológicos, la mala calidad de las plantas y la salud de los animales y el hombre. Por esta razón se están realizando investigaciones y buscando alternativas para el control de esta plaga. Según García (1997); cita que *Spodoptera frugiperda* es una plaga regulada biológicamente por diversas especies de parasitoides, de predadores y entomopatógenos las cuales en forma natural, reducen más del 50% de la población de larvas y pupas sin incluir el efecto de especies depredadoras. “Teniendo un papel muy importante, los nemátodos entomopatógenos; por las ventajas que ofrecen (Vázquez *et al.*, 2006)” (Rodríguez *et al.*, 2014, p. 2). Los nemátodos entomopatógenos reúnen atributos que les otorgan un interesante potencial como agentes de control biológico: poseen un amplio rango de insectos huéspedes, son hábiles para

buscar y perseguir larvas e insectos en el suelo, causan rápida mortalidad de ellos, tienen facilidad para ser reproducidos masivamente y ser aplicados, resultando seguros para el medioambiente y para los organismos que no son su objetivo (Merino & France, 2009).

En el Perú se han realizado diversas investigaciones en laboratorio y en los campos de cultivo. Un ejemplo de ello, es el proyecto que se realizó con nemátodos aislados de suelos de los andes peruanos (Junín 2750 msnm) perteneciente a la especie *Heterorhabditis sp* (Parsa et al., 2006) y también en el Valle de Chavimochic para cultivos de espárragos, donde se aislaron nemátodos perteneciente al género *Heterorhabditis* (Castillo *et al.*, 2006). En la región Lambayeque; autores como Córdova y Pérez (2010), y Baca (2012), también han realizado investigaciones sobre el Potencial Biocontrolador de nemátodos entomopatógenos nativos (*Rhabditida*) sobre *Agrotis sp.*, y sobre la eficacia parasítica del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* en larvas de *Spodoptera frugiperda*, obteniendo cada investigación resultados favorables para su uso como Biocontroladores.

Por lo tanto esta investigación servirá para determinar la concentración letal media (CL50) de los nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora*) sobre las larvas de cogollero en invernadero. Teniendo como objetivos específicos: Determinar el porcentaje de daño realizado por larvas de *Spodoptera frugiperda* en las plantas de maíz, determinar el porcentaje de mortalidad de las larvas de *S. frugiperda* por el control de *Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora* y establecer la mejor especie de nemátodo para el control de larvas de *Spodoptera frugiperda* en condiciones de invernadero. Lo que permitirá que los resultados obtenidos puedan ser aplicados para futuros controles de la plaga de cogollero en los campos de cultivo de maíz.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigaciones

“El nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) Cepa HC1 en estudios realizados ofrece las mayores potencialidades como agente de control biológico con demostrada patogenicidad sobre insectos de los órdenes Lepidóptera, Homóptera, Coleóptera e Himenóptera, su alto potencial reproductivo, infestividad, capacidad de búsqueda y penetración (Sánchez, 2002)” (Rodríguez et al., 2014).

Marrero (2006), estudió las susceptibilidades de las plagas *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith), *Plutella xylostella* (L.) y *Heliothis virescens* (F.) frente a las cepas P2M (*Heterorhabditis indica*) y los aislados CIAP-DEY-6 y CIAPDEY-7 (*Heterorhabditis* sp.) a nivel de laboratorio y también realizó ensayos de campo en los cultivos de maíz, col y tabaco (semillero) para determinar la efectividad de los nematodos entomopatógenos, aplicando concentraciones de 20, 30, 40, 50, 60,80,100 y 120 nematodos/larva a cada una de las especies. Obteniendo como resultado en laboratorio, que la concentración de 20 nemátodos/larvas a las 72 horas para *S. frugiperda*, indicó que la mortalidad fue del 100 % para las cepas CIAP-DEY-6 y CIAPDEY-7; no comportándose así la cepa P2M. Este mismo comportamiento tuvo lugar para las demás plagas. El instar más susceptible fue *S. frugiperda*, sin importar las concentraciones. La cepa más efectiva fue CIAP-DEY-7, seguida por CIAP-DEY-6. Y en los campos de maíz, los rendimientos fueron superiores en 1,2 T/ha con respecto a la parcela no tratada y 3 T/ha para el caso del rendimiento en verde.

Se han realizado numerosas investigaciones relacionadas a su aplicación para el control de plagas de importancia económica, como larvas rizófagas de coleópteros (Coleóptera: Scarabaeidae) (Mc Graw & Koppenhöfer, 2008).

En un estudio realizado en instalaciones del Laboratorio de Control Biológico de la universidad de Zamorano (Honduras), tuvo como propósito estimar la concentración y tiempo letal de *H. bacteriophora* producidos en Zamorano para el control del picudo (*C. sordidus*), realizándose un bioensayo en laboratorio; utilizando 8 tratamientos cuyas concentraciones fueron de 6,000, 2,406, 965, 387, 155, 62, 25 y 0 nemátodos/insecto. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, equivalente a 32 unidades experimentales, la población de picudos (*C. sordidus*) fue de 320 adultos a los cuales se les infecto con *H. bacteriophora*, evaluando la patogenicidad durante 15 días con intervalos de 12 hrs. Solamente con la concentración de 6000 nemátodos/insecto se obtuvo 97% de mortalidad al día 15. Se analizó los datos mediante un análisis probit para poder estimar la concentración letal y tiempo letal. Según la línea base se determinó la concentración letal para CL50 de 1220.4 y CL95 de 4816.5 nemátodos/insecto respectivamente (Morales Ramírez, 2012).

Estudios realizados en INIA Quilamapu (2009), con aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos han mostrado promisorios resultados en el control de especies como capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*), cabrito del duraznero (*Aegorhinus superciliosus*) y el gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*), todas especies que poseen estados larvales que habitan en el suelo alimentándose de raicillas y causando un severo daño a la planta (Merino & France, 2009).

En el Departamento de Entomología de la Universidad Federal de Lavras (UFLA), se realizó un estudio que tuvo como objetivo seleccionar nematodos entomopatógenos en base a la mortalidad de *S. frugiperda*. Para esto; se ajustó las concentraciones de nemátodos en el laboratorio y se evaluó la acción de estos organismos en condiciones de invernadero. Se ensayó 17 poblaciones de nemátodos a concentraciones de 100, 250 y 500 juveniles (IJ) / larvas infecciosas. En el invernadero, después de 7 días, las larvas y los nemátodos *Steinernema arenarium* y *Heterorhabditis* sp. RSC02 fueron agregadas (40 larvas, una larva / repetición). En el laboratorio, se realizaron pruebas con *S. arenarium* y *Heterorhabditis* sp. RSC02 causando mortalidad de 85 y 90%, respectivamente, seleccionándose después para el ensayo de concentraciones.

Las concentraciones de 150, 200, 250, 300, y 350 IJ/larvas se probaron; el cual a una concentración de larvas 200IJ/larva, *S. arenarium* y *Heterorhabditis sp.* RSC02 causó una mortalidad de 100 y 97.6% en laboratorio, respectivamente, y en el invernadero causó 77.5 y 87.5% de mortalidad, respectivamente, en comparación con el control (7.5%) (Andaló *et al.*, 2010).

“Sobre la patogenicidad de los insectos fitófagos del nemátodo *H. bacteriophora*, se han realizado estudios sobre larvas (*Cosmopolites sordidus* Germar) con resultados positivos de 100% de mortalidad, a las 96 horas después de la aplicación del nemátodo (Medina *et al.*, 2011)” (Salcedo, 2012).

En el Perú se han realizado ensayos, en laboratorio, con nemátodos aislados de suelos de los andes peruanos (Junín 2750 msnm) perteneciente a la especie *Heterorhabditis sp* Alcazar; donde en un periodo de 10 días, la mortalidad sobre *Premnotrypes suturicallus* (insecto plaga de la papa) en los estadios de pre-pupa y adultos, se obtuvo un porcentaje de 66%, 65% y 52% respectivamente (Parsa *et al.*, 2006) y en el Valle de Chavimochic se aisló de suelos, para cultivos de espárragos, nemátodos perteneciente al género *Heterorhabditis* el cual fue enfrentado a *G. mellonella* determinando de esta manera una dosis letal media (DL50) de 3.2 nemátodos/larva (Castillo *et al.*, 2006).

Estudio realizado en Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de ciencias Biológicas de la universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de la provincia de Lambayeque, Perú; se determinó el potencial Biocontrolador (parasitismo y mortalidad) de nemátodos entomopatógenos nativos en larvas de *Agrotis sp.*, realizando un ensayo; en el cual se inocularon larvas con una sola dosis de Nemátodos, 5000 nemátodos/ml, en vasos plásticos con 10 gr de arena estéril (4% P/P) y granos de maíz pregerminado, donde se agregaron 10 larvas de *Agrotis sp.* La evaluación se realizó 10 días después de la inoculación. Los resultados obtenidos mostraron una media de 62% de parasitismo y 32% de mortalidad, destacando una mayor actividad parasítica de los NEPs nativos sobre su actividad depredadora (Córdova & Pérez, 2010).

En un estudio realizado en el fundo "LA PEÑA" de la Facultad de agronomía de la Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo" (Lambayeque, Perú); tuvo como algunos de sus objetivos registrar el número de larvas vivas de *Spodoptera frugiperda* por parcela, evaluar el porcentaje de mortalidad de larvas y el porcentaje de eficiencia de control de *Heterorhabditis bacteriophora* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* en campo. Los resultados obtenidos fueron: El menor número de larvas vivas por parcela se obtuvo a los catorce días después de la cuarta aplicación; con 50 larvas vivas/parcela para el tratamiento de 300 nemátodos/ml. A los catorce días después de la cuarta aplicación, con Larvin 375F* se presentó el menor porcentaje de plantas infestadas (2.00%), seguido por el tratamiento 300 NEP/ml (5.00%). Se presentaron los mayores porcentajes de mortalidad a los catorce días después de la cuarta aplicación con los tratamientos Larvín 375F* (58.93%) y 300 nemátodos/ml (33.04%). Finalmente los mayores porcentajes de eficiencia de control se obtuvieron a los siete días después de la tercera aplicación con los tratamientos Larvín 375F* (69.15%) y 200 nemátodos (50.43%) (Baca, 2012).

2.2. Base teórica

2.2.1. Género: Heterorhabditis

Los nematodos entomopatógenos controlan de forma efectiva una gran variedad de plagas de insectos que causan daños económicos poseen además unas características importantes para ser utilizados como agentes de control biológico: son seguros para el medio ambiente, fauna y flora pueden producirse en grandes cantidades en medios artificiales y son fáciles de aplicar mediante simples equipos de pulverización, de irrigación o inyección. (Arteaga A., 2015).

a. Morfología

Los nemátodos entomopatógenos son definidos generalmente como gusanos invertebrados, debido a que poseen un cuerpo no segmentado, con un tracto digestivo completo. No tienen respiración y sistema circulatorio especializado, sin embargo, poseen sistemas nervioso y excretor bien desarrollados y juego de músculos longitudinales (Arteaga A., 2015).

b. Ciclo de vida

La familia de los heterorhabditidos son ovíparas u ovovivíparas. Inicialmente los huevos se ponen en el medio, pero en muchos casos eclosionan dentro del útero de la hembra desarrollando formas juveniles que se alimentan de los tejidos maternos. Este proceso se conoce como endotoquia matricida (Wang & Bedding , 1996). El ciclo de vida comienza cuando los juveniles infecciosos se encuentran con un host en el suelo, por ejemplo una raíz alimenticia de larvas de insectos. El nemátodo entra en el host a través de las aberturas naturales o a través de la cutícula de acogida. Una vez dentro de la cavidad del cuerpo las bacterias simbióticas asociadas se liberan de iniciar la patogenicidad y la reproducción de los nematodos. En Heterorhabditidos (*H. bacteriophora*), la primera generación de adultos son hermafroditas (por lo tanto una solo infectivo juvenil puede infectar y reproducirse en un huésped). La segunda generación es anfimícticas (machos y hembras). La muerte del huésped por lo general se produce rápidamente dentro de 2 días a alrededor de 20°C. Los nemátodos se alimentan y se reproducen dentro del cadáver, hasta que los nutrientes son agotados y una nueva generación de juveniles infecciosos se forma. El ciclo de vida por lo general se completa dentro de 2 semanas en 20°C y una nueva generación de juveniles infecciosos puede encontrarse en el suelo que rodea la sede de cadáver (Ehlers, 2003).

c. Mecanismo de infección

El tercer estadio juvenil, es el único estadio que vive fuera del insecto; dando lugar a la forma infectiva juvenil o larva “dauer”. Durante este periodo tiene la boca y el ano cerrados y no se alimenta. Este estadio juvenil es el responsable de la localización e infección de los insectos hospedadores (Kaya & Gaugler, 1993). Después de localizar a su hospedador, las formas infectivas juveniles penetran en él a través de aberturas naturales (boca, ano y espiráculos). Algunas especies pueden también penetrar a través de la cutícula (Peters & Ehlers, 1994), que en el caso de los heterorhabditidos es posible gracias a la posesión de un diente cuticular en la zona anterior (Bedding & Molyneux , 1982). Las formas infectivas juveniles que entran por el sistema traqueal o por el digestivo, deben atravesar sus paredes para llegar al hemocele.

Si la pared es frágil, como la de las traqueolas, ésta puede ser perforada fácilmente por presión mecánica. Las paredes del intestino, protegido en parte por la membrana peritrófica, son atravesadas por los heterorhabditidos con la ayuda de su diente proximal (Dowds & Peters, 2002). Cuando las larvas “dauer” llegan al hemocoele liberan la bacteria simbiote *Photorhabdus*; el cual sale a través de la boca de los heterorhabditidos (Ciche & Ensing, 2003). La bacteria se multiplica rápidamente, libera endotoxinas y exotoxinas, causando la muerte del hospedador por septicemia en 24 - 72 horas (Poinar, 1990). La bacteria permite el crecimiento y reproducción del nematodo al suministrarle alimento y produciendo agente antimicrobianos que inhiben el crecimiento de otros organismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, y elementos que protegen a los nematodos de insectos saprófagos (Koppenhöfer A. , 2007). Los nematodos se alimentan de la bacteria, se desarrollan y dan lugar a una o más generaciones, dependiendo del tamaño del hospedador. Cuando se agotan los recursos aparecen las nuevas formas infectivas que, tras incorporar la bacteria simbiote en su tubo digestivo, emergen del cadáver del insecto para buscar un nuevo hospedador (Adams & Nguyen, 2002).

d. Efecto de infección en larvas

La infección por nematodos entomopatógenos causa un cambio de color en los cadáveres producido por la bacteria asociada. Generalmente los insectos parasitados por heterorhabditidos toman un color rojizo, naranja, amarillo o verde. En este además se observa la emisión de bioluminiscencia producida por la bacteria simbiote, del genero *Photorhabdus*. Esta bioluminiscencia es debida a una enzima típicamente bacteriana, la luciferasa, que produce una luz azul-verdosa (490nm) (Poinar *et al.*, 1980). Sin embargo, el color de la cutícula del insecto es rojizo, debido presumiblemente al pigmento rojo producido por las bacterias que se acumula en esta, dando esta coloración (Meighen & Szittner, 1992).

2.2.2. *Spodoptera frugiperda*. “Gusano cogollero”

El gusano cogollero es la larva de la mariposa nocturna *Spodoptera frugiperda*, que ataca principalmente al maíz (Chango Amaguaña, 2012, p. 20). En diversas entidades del país se han registrado pérdidas causadas por este insecto que van desde 13 hasta 60%. Los daños más serios corresponden a las zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales. Su distribución es muy amplia, ocurre en todas las zonas productoras de maíz (Yáñez, 2007).

a. Morfología

Presenta dimorfismo sexual, las características distintivas del macho son: expansión alar de 32 a 35 mm; longitud corporal de 20 a 30 mm; siendo las alas anteriores pardo-grisáceas con algunas pequeñas manchas violáceas con diferente tonalidad, en la región apical de estas se encuentra una mancha blanquecina notoria, orbicular tiene pequeñas manchas diagonales, una bifurcación poco visible que se extiende a través de la vena costal bajo la mancha reniforme; la línea subterminal parte del margen la cual tiene contrastes gris pardo y gris azulado. Las alas posteriores no presentan tintes ni venación coloreada, siendo más bien blanquecina, las hembras tienen una expansión alar que va de los 25 a 40 mm, faltándole la marca diagonal prominente en las anteriores que son poca agudas, grisáceas, no presentan contrastes; la mancha orbicular es poco visible; la línea postmedial doble y fácilmente vista (Ortiz, 2010).

b. Ciclo biológico

b.1. Huevo o postura

Individualmente son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión. Las hembras depositan los huevos corrientemente durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos (Chango Amaguaña, 2012).

b.2. Larva o gusano

Las larvas al nacer se alimentan del coreon, más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida. Las larvas pasan por 6 a 7 estadíos o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros; en el primero estas miden hasta 2-3 milímetros y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 milímetros y la cabeza es carmelita claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 milímetros en su último estadío. A partir del tercer estadío se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se abre o desenvuelve (Chango Amaguaña, 2012).

b.3. Pupa

Son de color caoba y miden 14 a 17 milímetros de longitud, con su extremo abdominal (cremaster) terminando en 2 espinas o ganchos en forma de "U" invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta los 8 a 10 días en que emerge el adulto o mariposa (Chango Amaguaña, 2012).

b.4. Adulto o mariposa

La mariposa vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen arabescos o figuras irregulares llamativas en las alas delanteras, y las traseras son blancas. En reposo doblan sus alas sobre el cuerpo, formando un ángulo agudo que permite la observación de una prominencia ubicada en el tórax. Permanecen escondidas dentro de las hojarasca, entre las malezas, o en otros sitios sombreados durante el día y son activas al atardecer o durante la noche cuando son capaces de desplazarse a varios kilómetros de distancia, especialmente cuando soplan vientos fuertes (Chango Amaguaña, 2012).

2.2.3. Cultivo de maíz (*Zea mays*)

El maíz, como producto de valor, ha evolucionado positivamente a lo largo de su historia. Con el correr de los años, las industrias vinculadas a la cadena del maíz se han ido desarrollando en forma progresiva, transformando un grano cuyo único destino era la alimentación humana en una materia prima esencial para el desarrollo de múltiples procesos industriales (ILSI Argentina, 2006).

a. Morfología

“Gudiel (1997) indica que, el maíz es una planta anual de la familia de las gramíneas, originaria de América. Es monoica por tener separadas las flores masculinas y femeninas. Los tallos pueden alcanzar de 0,75 a 2,00 m de altura, 3 a 4 cm de grosor y normalmente tiene 14 entrenudos, los que son cortos y gruesos en la base y que se van alargando a mayor altura del tallo, reduciéndose en la inflorescencia masculina, donde termina el eje del tallo. Tiene un promedio de 12 a 18 hojas, con una longitud entre 30 y 150 cm y su anchura puede variar entre 8 a 15 cm. La planta posee flores masculinas y femeninas separadamente, siendo las masculinas las que se forman al final del tallo y las femeninas las que se forman en las axilas de las hojas sobre el tallo principal, distinguiéndose por los pelos del elote en formación. Las plantas son fecundadas por polinización cruzada y en algunos casos por autofecundación. Su reproducción se hace por semillas, las que conservan su poder de germinación durante tres a cuatro años” (Chango Amaguaña, 2012).

b. Requisitos para su desarrollo

b.1. Suelo

Martínez y Tico (1997) dicen que el maíz prefiere los suelos arcillo-silíceos. No obstante se adapta bien a distintos suelos que estén bien trabajados y debidamente abonados. Torregrosa (1997) afirma que, para obtener una buena cosecha, el maíz debe cultivarse en suelos fértiles, bien drenados y relativamente livianos, los cuales han de ararse y rastrarse anticipadamente, para que las semillas encuentren una cama mullida, suelta y libre de terrones. Esto garantiza una buena germinación y normal crecimiento de las plántulas. El maíz es muy sensible a los suelos mal aireados.

b.2. Agua

Galarza (1996) indica que los riegos deben permitir que el suelo esté en un estado perfecto de humedad de tempero. Si el suelo sufre sequedad da lugar a un embastecimiento de los tejidos y por tanto, a una pérdida de calidad. Cuando está en las primeras fases de su desarrollo el riego debe ser abundante y regular, ya que la plántula debe tener un crecimiento continuo. Se puede regar tanto por gravedad como por riego localizado. En todo su ciclo este cultivo sufre estrés si hay escasez de agua en el suelo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por Larvas de *S. frugiperda*, nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora*), larvas de *Galleria mellonella* y semillas de maíz amarillo duro.

3.1.2. Población y muestra

En la investigación la población estuvo constituida por los Nemátodos entomopatógenos nativos (*Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora*) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), sede Vista Florida de Lambayeque. Para obtener la muestra se calculó el volumen de la solución de infectivos juveniles que se necesitó en cada concentración.

La población de *Spodoptera frugiperda* que se considero fue del Distrito de Reque, Lambayeque; por lo tanto, la muestra fue recolectada de los cultivos de maíz del distrito, realizando una crianza posterior en el laboratorio de Controladores Biológicos del INIA (sede Vista Florida, Lambayeque).

3.2. Métodos

3.2.1. Variables de la investigación

En el proceso de investigación se midieron y controlaron las siguientes variables:

- Variable independiente: Concentración Letal Media (CL50) de los nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora*).
- Variable dependiente: Mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

3.2.2. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue el diseño de estímulo creciente (Goode & Hatt, 1986). Se utilizaron tres tratamientos: (T0) Grupo control, T1 (*Heterorhabditis* sp.) y T2 (*H. bacteriophora*). Para T1 y T2 se utilizó cuatro diferentes concentraciones de infectivos juveniles (Ijs) (200, 300, 500 y 750 Ijs/larva/planta); menos para T0 (0 Ijs/larva/planta). Cada concentración por tratamiento tuvo a 30 larvas de cogollero como unidad experimental, las mismas que fueron colocadas individualmente en plantas de maíz, sembradas en invernadero. Se realizaron en total tres repeticiones para los tratamientos (Fig. 1).

3.2.3. Localización de la investigación

Esta investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Controladores Biológicos y en el Invernadero del Área de Forestales del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) – Estación Experimental Agraria, Vista Florida (EEA - VF), Lambayeque. Ubicado en el km 8 de la carretera Chiclayo – Ferreñafe (Fig. 2), con Latitud: 6°43'34.71"S, Longitud: 79°46'46.97"O y Elevación: 42 msnm.

3.2.4. Cronología de la investigación

Para el correcto desarrollo de la investigación se elaboró una línea de tiempo (Fig. 3), donde cada repetición tuvo una duración de 30 días calendario aproximadamente.

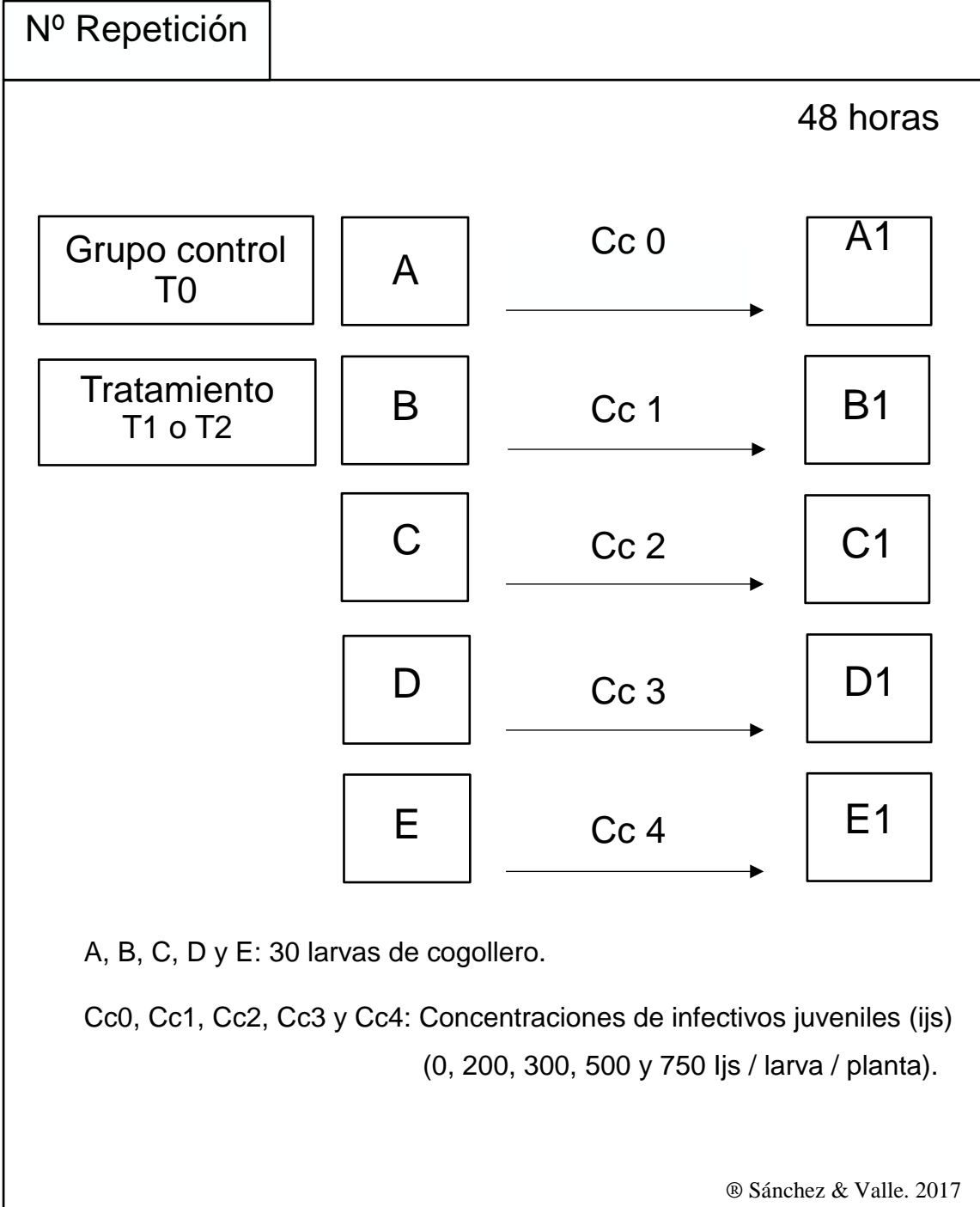


Fig. 1 Diseño de estímulo creciente para determinar la Concentración Letal Media a las 48 horas (CL50-48) de los tratamientos con *H. sp.*, y *H. bacteriophora*.

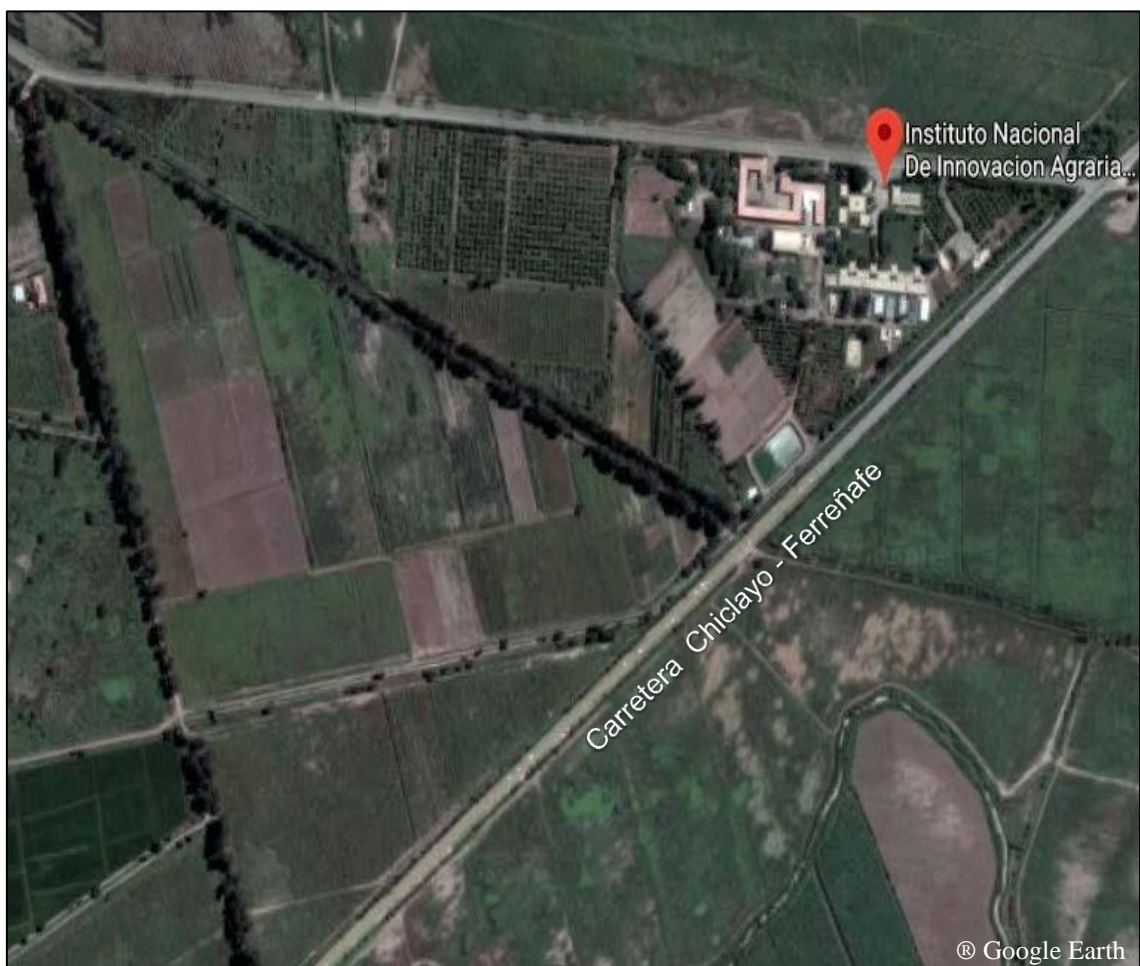


Fig. 2 Mapa de ubicación del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), EEA – Vista Florida, Lambayeque, 2017.

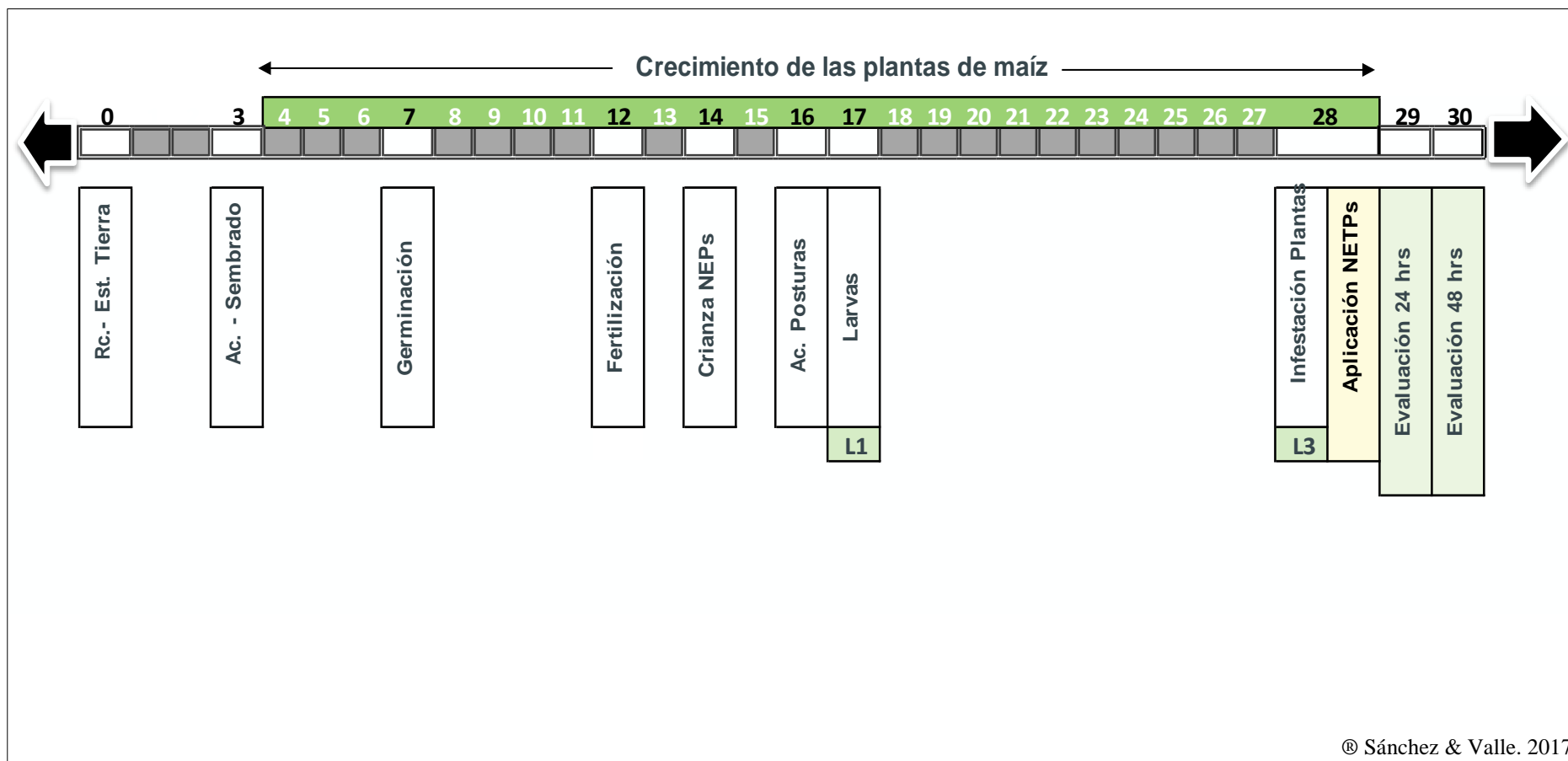


Fig. 3 Línea de tiempo para el desarrollo del proyecto: Determinación CL50 de nemátodos entomopatógenos *H. bacteriophora* y *H. sp.*

3.2.5. Acondicionamiento para la siembra de maíz en invernadero

a. Recolección y desinfección de la tierra de cultivo

La tierra utilizada para la siembra del maíz en invernadero, se recolectó del sector 1-1 de las zonas de cultivo del INIA (sede Vista Florida, Lambayeque), ubicado al frente de la carretera a Agrorural Lambayeque, teniendo como coordenadas una Latitud: 6°43'36.28"S, Longitud: 79°46'53.85"O, y una área de 4 080 m² (Fig. 4). La tierra necesaria para cada ensayo fue alrededor de 1 tonelada, y con ayuda de un balde plástico de 20 litros, se calculó la cantidad a extraer (Fig. 5 – A, B). Finalmente se trasladó la tierra en una camioneta, cerca al invernadero del área de Forestales de la Institución, donde se procedió a colocar sacos sintéticos de color negro en la vereda para descargar. Para la desinfección de la tierra recolectada, se utilizó 2 mochilas a presión de 20 litros, conteniendo una solución de 5 ml de formol y un aproximado de 20 litros de agua (Fig. 5 – C, D). Se humedeció la tierra uniformemente con la solución, removiendo y dejando en reposo alrededor de 3 días (Fig. 6 – E, F).



Fig. 4 Ubicación de la zona de cultivo del sector 1-1 de INIA (EEA – Vista Florida), Lambayeque, 2017.



Fig. 5 Proceso de Extracción, desinfección y acondicionamiento. Extracción de tierra de las zonas de cultivo, Sector 1-1 de INIA (EEA - Vista Florida) (A, B). Preparación de solución de formol (C, D). Proceso de desinfección de tierra del área de Forestales de INIA (EEA – Vista Florida), aplicación y remoción de solución de formol en la tierra (E). Llenado de macetas y acondicionamiento en invernadero. (F, G).

© Sánchez & Valle. 2017

b. Siembra de semillas de maíz

Al día 3, se procedió a verter 4 kg de tierra en cada maceta, aproximadamente (Fig. 5 - F). Utilizando en total 270 macetas, las cuales fueron trasladadas y debidamente ordenadas en el invernadero del sector de Forestales (Fig. 5 - G) (Anexo 1). Posteriormente se procedió a sembrar una semilla de maíz en cada maceta, introduciéndolas a una profundidad no menor de 4 cm (Fig. 6 - A). Con el fin de identificar los tratamientos se procedió al etiquetado de carteles, utilizando hojas impresas donde se indicó las concentraciones, controles y muestras utilizadas durante los ensayos (Fig. 6 - B). Al día 7, se procedió a verificar la germinación de las plantas de maíz (Fig. 7 A).

c. Fertilización de la tierra

Al día 12, se procede a fertilizar la tierra, utilizando 5 gr de fertilizante (urea, sulfato amónico y sulpomag) por maceta. Mediante el uso de una espátula se hizo un agujero de 4 cm de profundidad por 6 cm de espesor, donde se vertió y tapo con tierra el fertilizante, humedeciéndola posteriormente con agua destilada (Fig. 7 - B).

Las plantas de maíz se regaron tres veces a la semana (alrededor de 2,5 L de agua por maceta), desde la siembra de las semillas hasta que las plantas de maíz amarillo duro alcanzaron el estadio vegetativo V5. Se utilizó agua de grifo del mismo Invernadero para el riego.

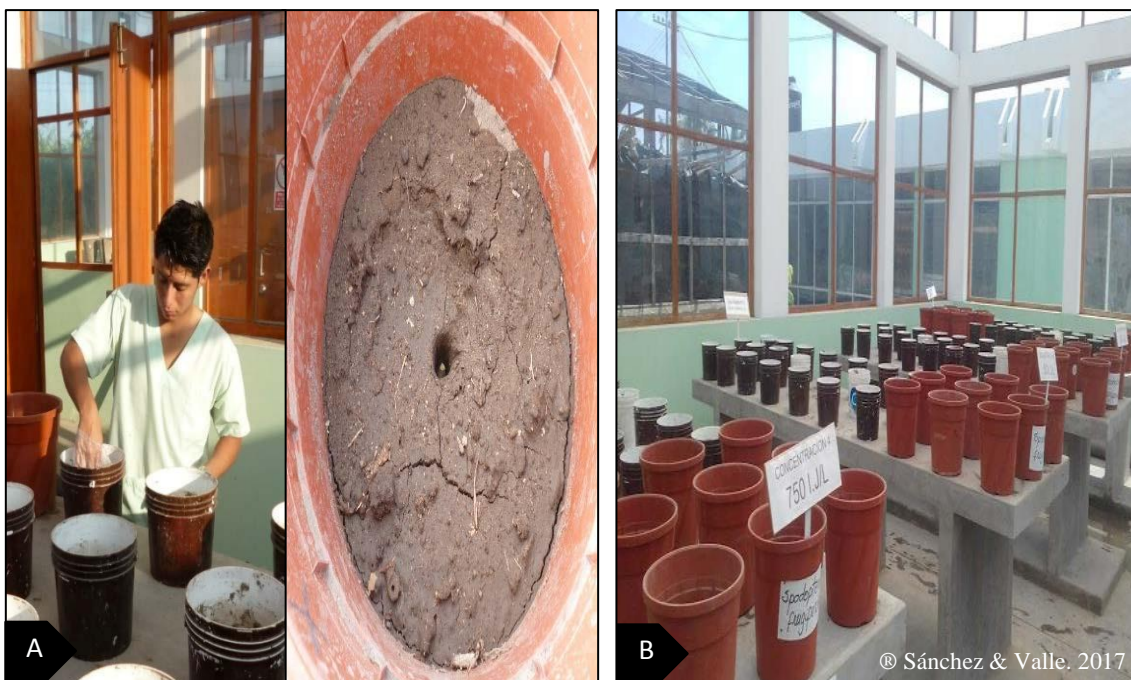


Fig. 6 Siembra de las semillas de maíz amarillo duro (A). Etiquetado de carteles para identificar los tratamientos en el Invernadero del área de Forestales de INIA (EEA – Vista Florida) (B)



Fig. 7 Germinación de plantas de maíz (4 días después de la siembra de las semillas de maíz amarillo duro (A). Fertilización de la tierra después de 5 días de la germinación de maíz amarillo duro en el Invernadero del área de Forestales de INIA (EEA – Vista Florida). (B).

3.2.6. Crianza de *Spodoptera frugiperda* en Laboratorio

La crianza de cogollero que se realizó en el laboratorio, nos sirvió para tener a disposición la cantidad necesaria de larvas de cogollero en estadio larval L3, las que se utilizaron para realizar los ensayos en las plantas de maíz en el Invernadero. El ciclo biológico de cogollero en laboratorio fue aproximadamente de 32 días bajo condiciones controladas. Por ende la crianza de cogollero se realizó aproximadamente con un mes de anticipación a cada ensayo.

a. Ubicación y obtención de posturas de cogollero

Las primeras 60 masas de posturas de cogollero se recolectaron de los campos de cultivo de maíz del Distrito de Reque, Lambayeque (Fig. 8 - B), ubicado en la carretera a Montegrande, a 1.9 km del Centro de salud de la ciudad de Reque, teniendo como coordenadas una Latitud: 6°51'16.51"S, Longitud: 79°48'18.91"O, y un área de 2 608 m² (Fig. 8 - A). El material utilizado para la colección fueron tijeras y tapers con mallas (desinfectados y esterilizados previamente con alcohol de 96%). Ubicando las posturas en el haz de las hojas de las plantas, se procedió a realizar un corte rectangular, extrayéndolas para su transporte en tapers de 1L de capacidad, con hojas recortas de maíz.



Fig. 8 Ubicación de la zona de cultivo del distrito de Reque, Lambayeque, 2017 (A). Campo de cultivo – Distrito de Reque. (B)

b. Acondicionamiento de posturas en el laboratorio

Las posturas recolectadas (Fig. 9 - A) fueron trasladadas al laboratorio de Controladores Biológicos de INIA, Estación Experimental Agraria - Vista Florida, donde se acondicionaron en recipientes transparentes de 1L (desinfectados con alcohol de 96%) (Fig. 9 - B). Para mantener viables las posturas en laboratorio se utilizaron hojas cortadas en retazos de *Ricinus communis* (Higuerilla) de las zonas cercanas a la Institución, utilizándolas como base para proporcionarles humedad hasta su eclosión. La temperatura en laboratorio fue de 23°C, y la transición de postura a larva fue de alrededor de 3 días.

c. Acondicionamiento de estadios larvarios

Al tercer día del ciclo de vida, cuando las larvas emergen de las posturas; ahora en L1 son acondicionadas en recipientes transparentes de 1L de capacidad, previamente lavados y desinfectados con alcohol al 96 %. La alimentación se realiza con hojas de higuerilla en retazos hasta alcanzar el estadio L3 (11 días después de la eclosión de las posturas).

Las larvas en estadio L3 son distribuidas en tapers de 30cmx20cmx10cm, de la siguiente manera (Fig.9 - C):

- ✓ Se coloca en la base de cada taper papel bond y 4 hojas enteras de higuerilla.
- ✓ Se deposita 60 larvas en estadio L3 por taper.
- ✓ Se apilan encima 4 hojas de higuerilla y se procede a tapar con una tela color negro.

Este procedimiento se realiza con el fin de evitar el canibalismo.

El proceso de acondicionamiento antes descrito se realizó de manera interdiaria hasta alcanzar el estadio de pupa.

d. Acondicionamiento de Pupas

Alcanzado el estadio de pupa, estas se acondicionaron en tapers transparentes con porciones de aserrín desinfectado (Fig. 9 - D). Se utilizó 2.5 Kg de aserrín, los cuales fueron desinfectados en 5 Litros de agua a temperatura de ebullición, durante el lapso de una hora. El aserrín es humedecido con un aspersor de agua para darle humedad a las pupas y favorecer su proceso,

realizándolo de manera diaria hasta alcanzar el estadio adulto (10 -12 días aproximadamente). El tiempo de transición de postura a pupa fue de 22 días aproximadamente.

e. Acondicionamiento de adultos

Para el acondicionamiento de los adultos de cogollero, se utilizaron recipientes plásticos de 1.5 L (desinfectados con alcohol de 96%), conteniendo dentro:

- ✓ Un “florero”, el cual fue armado con un recipiente de vidrio de 20 ml y hojas tiernas de *Ricinus communis* (Higuerilla)
- ✓ Dos esponjas recortadas y dos pequeños envases, conteniendo miel y agua destilada, respectivamente.
- ✓ Papel craft, recubriendo la pared interna del recipiente.

Después de realizar el acondicionamiento de los tapers, se seleccionó a los adultos, entre machos y hembras, siendo en total alrededor de 30 adultos por taper. Para el traspaso de los adultos se utilizó tubos de ensayo de 200 mm x 18 mm. Una vez acondicionado los adultos, se aseguró la boca del recipiente con una malla transparente, realizando cambios de recipientes 3 veces por semana (Fig. 9 - E). El tiempo de la reproducción u ovoposición de los adultos comenzó después del primer al segundo día y prosiguió hasta los 10 días posteriores de su acondicionamiento. Por tanto, este sistema tiene como objetivo principal el apareamiento u ovoposición de los adultos de cogollero (Fig. 9 - F).

f. Resultado de la crianza de la plaga de cogollero en laboratorio

La crianza de cogollero en el laboratorio durante el mes de Mayo, recuperó la mayor cantidad de estadios larvales (L1 - L7) y adultos. En los meses de Julio y Agosto, se recuperó menor cantidad de posturas, estadios larvales y adultos, pero las cantidades obtenidas sirvieron para realizar los ensayos en el Invernadero. Gracias a esto también se estimaron las fechas para realizar los ensayos (Anexo 2).



Fig. 9 Posturas de cogollero colectadas de la zona de cultivo del distrito de Reque, Lambayeque (A). Recipientes acondicionados con larvas en estadio larval L1 (B). Tapers acondicionados con higuerilla para larvas en estadio L3 a L6 (C). Acondicionamiento de pupas en aserrín desinfectado (D). Tapers acondicionados con mariposas de *G. mellonella*. (E). Posturas ovopositadas en malla de la crianza en laboratorio (F).

3.2.7. Crianza de Nemátodos Entomopatógenos

Según la línea de tiempo del proyecto, la crianza de los nemátodos entomopatógenos se realizó en el día 14 (Fig. 3). Las dos especies de nemátodos entomopatógenos fueron suministrados por el Laboratorio de Controladores Biológicos del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) – EEA Vista Florida. El ciclo biológico de los nemátodos en laboratorio fue alrededor de 14 días aproximadamente, utilizando el método de crianza según los protocolos mencionados por San Blas *et al.* (2014), con modificaciones que se llevaron a cabo en el mismo laboratorio:

a. Unidades de crianza

Para la crianza masiva de nemátodos entomopatógenos se utilizaron Larvas de *Galleria mellonella* contenidas en tapers de plásticos con su respectiva tapa (Fig. 10 - A).

b. Parasitación

Se acondicionan dos tapers de 10cmx5cmx5cm para cada especie de nematodo, colocando en la base papel toalla, para depositar las larvas de *G. mellonella* que serán roseadas con 15 ml de una solución de infectivos juveniles (*H. bacteriophora* y *H. sp.*, respectivamente), procediendo a etiquetar y tapar cada taper (Fig. 10 - B).

c. Cámara húmeda

Después de 5 - 6 días de la parasitación efectiva (Fig. 10 – C, D), se traspasan las larvas de *G. mellonella* parasitadas en dos tapers de 30cmx20cmx10cm (respectivamente para cada especie de nemátodo), que dentro tendrán una base a manera de columna y una rejilla. Posteriormente se agregará 30 ml de agua destilada en la base, colocando una etiqueta y tapa a cada uno (Fig. 10 - E).

d. Cosecha

Esta etapa consiste básicamente en el enjuague de la rejilla, la base y el interior del taper que contiene las larvas parasitadas, con ayuda de una piseta llena con agua destilada, el cual se realiza a los 6 -7 días de haber acondicionado la cámara húmeda (Fig. 10- F).

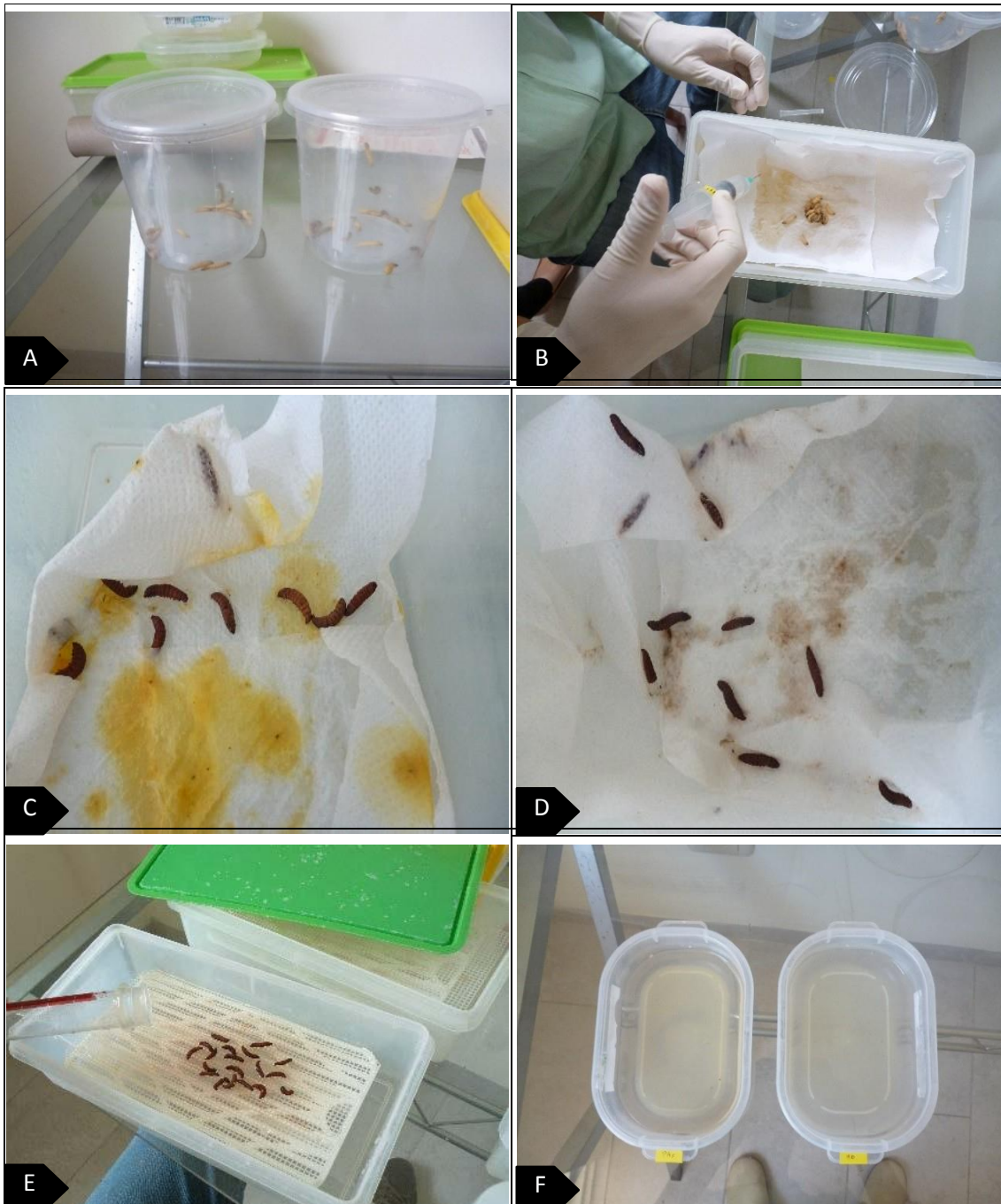


Fig. 10 Tapers con larvas de *Galleria mellonella* seleccionadas para la parasitación (A). Aplicación de solución de nemátodos Entomopatógenos a las larvas de *G. mellonella* (B). Parasitación efectiva a las 72 horas con los nemátodos: *H. sp* (C) y *H. bacteriophora* (D). Acondicionamiento de cámara húmeda de las larvas parasitadas con nemátodos (E). Cosecha y recuperación de infectivos juveniles de los nemátodos Entomopatógenos (F).

3.2.8. Aplicación de los tratamientos

Esta fase se realizó aproximadamente a los 24 días después de haber sembrado las semillas de maíz en el Invernadero, aproximadamente cuando estas han alcanzado el estadio V5 (donde la formación de hojas estará completa, el ápice del tallo está justo por debajo de la superficie del suelo y la planta tiene una altura total aproximada de 20 cm) (Ritchie *et al*, 1986).

Tanto la infestación de las plantas de maíz con las larvas de cogollero y la aplicación de los tratamientos con los infectivos juveniles, se realizó el mismo día 28 (Fig. 3).

a. Infestación de las plantas de maíz con larvas de cogollero

En el día 16, según la línea de tiempo, para obtener las larvas de cogollero en estadio L3, se procedió a acondicionar posturas obtenidas de la crianza de cogollero en Laboratorio. Pasando de huevo a larva en estadio L3, unos 11 - 12 días después de eclosionar (Fig. 3). Por consiguiente se procedió a seleccionar las larvas de cogollero *S. frugiperda* en estadio L3, diferenciándolas por el tamaño de estas, ya que alcanzan un tamaño aproximado de 8 a 10 mm (DuPont Pioneer, s.f.).

Para la infestación, se separaron 3 tapers grandes colocando 90 larvas en cada uno, sumando en total 270 larvas (Fig. 11 - A). Por último se procedió a colocar una larva de cogollero en cada planta de maíz, cuidando que entre en el cogollo y no salga (Fig. 11 - B).

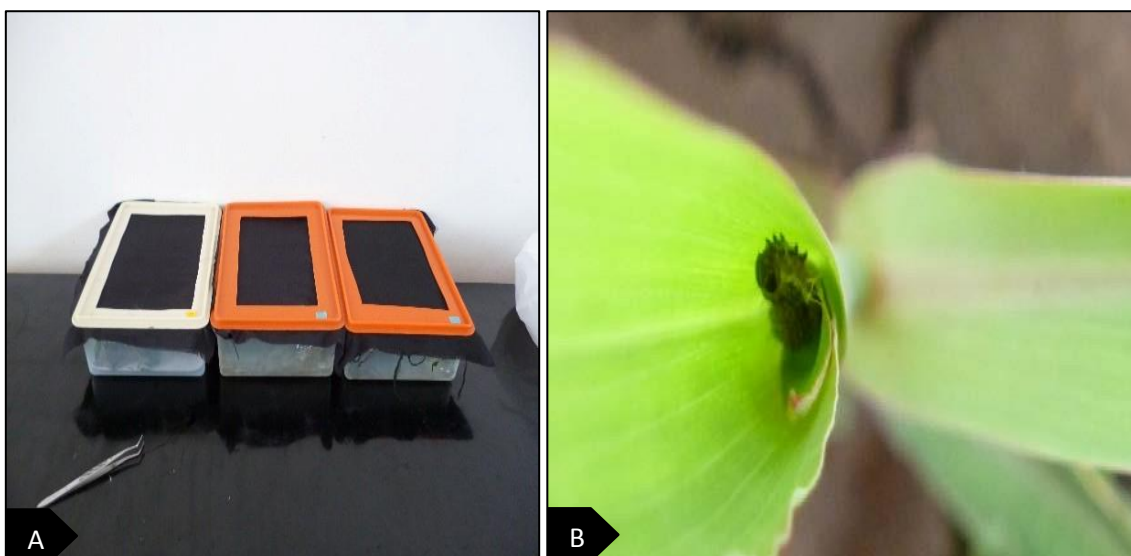


Fig. 11 Infestación de larvas de cogollero en estadio L3 en las plantas de maíz. (A) Tapers con larvas de cogollero L3 seleccionadas (B) Larva de cogollero dentro del cogollo del maíz.

b. Cálculo de la solución de infectivos juveniles para cada concentración

Culminado la crianza de los nemátodos en laboratorio según la cronología de la investigación, primero se estimó la cantidad de infectivos juveniles que se utilizó para la aplicación de los tratamientos por cada ensayo (Tabla 1).

Tabla 1

Cantidad total de infectivos juveniles (Ijs) requerido para cada concentración de los tratamientos

Concentración (Ijs/larva/planta)	<i>H. sp.</i>	<i>H. bacteriophora</i>
200	6 000 Ijs	6 000 Ijs
300	9 000 Ijs	9 000 Ijs
500	15 000 Ijs	15 000 Ijs
750	22 500 Ijs	22 500 Ijs
Total	52 500 Ijs	52 500 Ijs

Luego se calculó el volumen de infectivos juveniles, realizando un conteo con base en el procedimiento planteado por Gonzáles Ramírez (1995):

- ✓ Sedimenta la solución con NEPs y desecha la parte superior del líquido con la intención de obtener un concentrado.
- ✓ Del concentrado obtenido se toma 0.1 ml mediante una pipeta. Para el conteo se utiliza una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro dividida en cuadrículas, donde se colocará la muestra y se observará bajo un microscopio estereoscópico.
- ✓ Utilizando la fórmula de $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ (donde, V: volumen y C: concentración), se realiza una estimación de cuántos infectivos juveniles se encontraban en la suspensión (Tabla 2).

Tabla 2

Volumen total (ml) de la solución de infectivos juveniles (Ijs), calculados según fórmula para cada Repetición

Nemátodo	Ijs	Volumen (ml)		
		1° Repetición	2° Repetición	3° Repetición
<i>H. sp.</i>	52 500	20,27 ml	164,10 ml	43,75 ml
<i>H. bacteriophora</i>	52 500	56,64 ml	105,00 ml	47,73 ml

Nota. Las cantidades de nemátodos total por especie se ajustaron para su aplicación en invernadero; ya que por especie se requirió 52 500 ijs.

Para el cálculo del volumen a extraer de cada concentración de los nemátodos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_e = \frac{V_o \times C_u}{C_o}$$

Donde:

V_e = Volumen a extraer de la solución de Ijs

V_o = Volumen obtenido de la solución de Ijs

C_u = Concentración a utilizar de Ijs

C_o = Concentración obtenida de Ijs

Una vez obtenido el volumen de la concentración de los infectivos juveniles (Ijs), se elaboró una solución de Agar al 0,1 % (Anexo 3) y se procedió a obtener los volúmenes finales para cada tratamiento (Tabla 3 y 4).

Tabla 3

Carta de Volúmenes finales (ml) para el tratamiento con H. sp.

Concentración (ljs/larva/planta)	1º Repetición			2º Repetición			3º Repetición		
	Vol. Sol. ljs	Vol. Sol. Agar 0.1%	Vol. Agua Destilada	Vol. Sol. ljs	Vol. Sol. Agar 0.1%	Vol. Agua Destilada	Vol. Sol. ljs	Vol. Sol. Agar 0.1%	Vol. Agua Destilada
200	0,07 ml	10 ml	4,93 ml	0,62 ml	10 ml	4,38 ml	0,17 ml	10 ml	4,83 ml
300	0,10 ml	10 ml	4,90 ml	0,93 ml	10 ml	4,07 ml	0,25 ml	10 ml	4,75 ml
500	0,19 ml	10 ml	4,81 ml	1,56 ml	10 ml	3,44 ml	0,42 ml	10 ml	4,58 ml
750	0,28 ml	10 ml	4,72 ml	2,34 ml	10 ml	2,66 ml	0,63 ml	10 ml	4,37 ml

Tabla 4

Carta de volúmenes finales (ml) para el tratamiento con H. bacteriophora

Concentración (ljs/larva/planta)	1º Repetición			2º Repetición			3º Repetición		
	Vol. Sol. ljs	Vol. Sol. Agar 0.1%	Vol. Agua Destilada	Vol. Sol. ljs	Vol. Sol. Agar 0.1%	Vol. Agua destilada	Vol. sol. ljs	Vol. sol. Agar 0.1%	Vol. Agua Destilada
200	0,21 ml	10 ml	4,79 ml	0,40 ml	10 ml	4,60 ml	0,18 ml	10 ml	4,82 ml
300	0.32 ml	10 ml	4,68 ml	0,60 ml	10 ml	4,40 ml	0,27 ml	10 ml	4,73 ml
500	0.53 ml	10 ml	4,47 ml	1,00 ml	10 ml	4,00 ml	0,45 ml	10 ml	4,55 ml
750	0,80 ml	10 ml	4,20 ml	1,50 ml	10 ml	3,50 ml	0,68 ml	10 ml	4,32 ml

c. Método de aplicación

Para la aplicación de los tratamientos se usó unos rociadores de agua (tipo Pulverizador de gatillo, dosis/pulsación de 0,90 ml. (agua destilada), dispersión de 130 mm a distancia 200 mm, ángulo dispersión de 40°, durabilidad de 2 000 pulsaciones, material base de polipropileno, volumen de 200 ml aproximadamente), que contenían la solución de infectivos juveniles, el volumen de Agar al 0,1 % y agua destilada que se calculó para las concentraciones de cada tratamiento. Los rociadores se aplicaron a una distancia de 15 cm y directo al lugar donde fueron depositadas las larvas L3 de *S. frugiperda*, tratando de que estas sean bañadas por los volúmenes finales (Fig. 12 - A, B).

d. Registro de la Temperatura en el Invernadero

La temperatura en invernadero dependió si los días eran nublados o soleados, por eso se realizaron mediciones durante los meses que se realizaron los ensayos. El registro de mayor temperatura promedio en el invernadero se dio en el mes de Junio (temperatura máxima de 42,2°C; en un día soleado). Mientras que el registro de menor temperatura promedio se dio en el mes de septiembre (temperatura mínima de 23,9° C; en un día nublado) (Tabla 5).

Tomando en consideración los registros de temperatura promedio en el invernadero, se decidió realizar las aplicaciones de los tratamientos durante las 18:00 horas, registrándose en el mes de Junio una mayor temperatura (30°C), en comparación a los meses de Agosto y septiembre donde se registró una temperatura moderada (24,9°C y 23,6°C respectivamente).

Tabla 5

Temperatura promedio en el Invernadero del área de Forestales de INIA (EEA - VF)

Mes	Días soleados		Días nublados	
	mínima	máxima	mínima	máxima
Junio	37,3°C	42,2°C	30,9°C	39,6°C
Agosto	34,8°C	40,4°C	25,3°C	33,5°C
Septiembre	30,6°C	38,9°C	23,9°C	30,1°C



Fig. 12 Método de aplicación de los tratamientos. (A) Aplicación con la solución final de *H. bacteriophora* (B) Aplicación con la solución final de *H. sp.*

3.2.9. Evaluaciones

Según la línea de tiempo del proyecto, las evaluaciones para los ensayos se realizaron a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos (Fig. 3).

La evaluación del daño en plantas se realizó a las 48 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos. Para la evaluación, se tuvo que observar de manera directa si las plantas de maíz presentaban vestigios de raspaduras en las hojas y/o daño en el interior del cogollo, siendo esta la principal característica de alimentación de las larvas de cogollero en su tercer estadio larval (L3) (Ortiz, 2010). (Tabla 6).

Para la evaluación de la mortalidad primero se hizo una recolección a las 24 y 48 horas posterior a la aplicación, acondicionando placas Petri segmentadas a la mitad, esterilizadas con alcohol de 96% y colocando papel filtro dentro de ellas (Fig. 13). Con el propósito de comprobar la parasitación efectiva de las larvas de cogollero, se diseccionó las larvas de cogollero según la concentración de infectivos juveniles, para su posterior observación en el estereoscopio. Y al final de las 48 horas después de la aplicación de los tratamientos se registró el total de larvas muertas (Tabla 7). Por ultimo para el cálculo del porcentaje de mortalidad se tomó como referencia los datos recolectados de las larvas muertas, aplicando la siguiente fórmula citada por Ruiz (1995):

$$M \% = \frac{Lm \times 100}{Lm + Lv}$$

Donde:

M: mortalidad en porcentajes.

Lm: número de larvas muertas.

Lv: número de Larvas vivas.

Tabla 6

Registro de Daño en Plantas de Maíz por las Larvas de Cogollero después de Aplicar los Tratamientos

Concentración (ljs/larva)	<i>H. bacteriophora</i>			<i>H. sp</i>		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
200	21	26	22	24	26	25
300	18	22	21	22	23	24
500	14	21	18	21	22	21
750	13	20	15	21	22	19

Nota. El total de plantas del Grupo Control (30) presentó daño, en las tres repeticiones.

Tabla 7

Registro de Mortalidad de las Larvas de Cogollero después de Aplicar los Tratamientos

Concentración (ljs/larva)	<i>H. bacteriophora</i>			<i>H. sp</i>		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
200	19	15	14	14	15	13
300	21	20	17	15	16	15
500	25	23	21	17	17	17
750	27	25	24	22	19	20

Nota. El Grupo Control no registró ninguna larva muerta, en las tres repeticiones.



Fig. 13 Muestra de larvas de cogollero muertas, recolectadas a las primeras 24 a 48 horas después de la aplicación de los tratamientos

3.2.10. Análisis estadístico

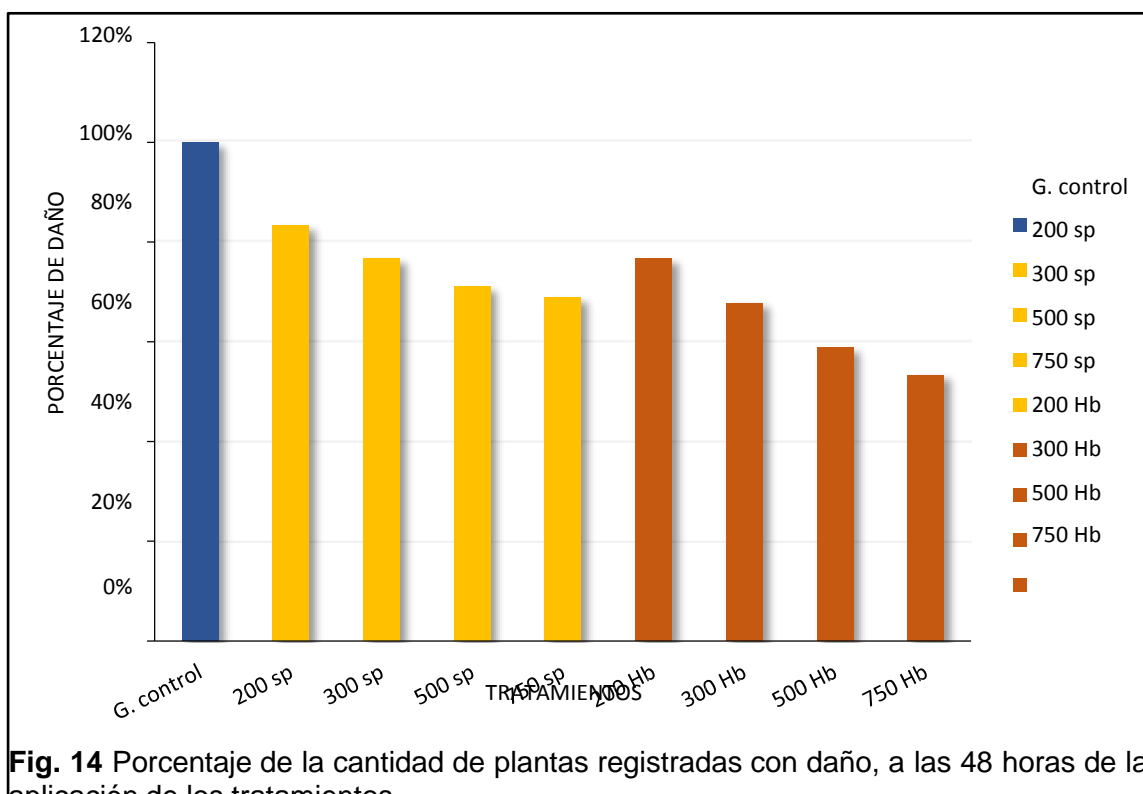
Para validar y comparar los resultados, se realizaron análisis de varianzas de un factor para la cantidad de plantas que registraron daño, la mortalidad de los tratamientos, repeticiones de los ensayos y un análisis post hoc (HSD Tukey) para cada tratamiento. También se realizó un análisis de varianza con diseño de bloques aleatorizados para ambos tratamientos, seguido de un análisis comparativo simultáneo de Tukey (considerándose significativo $p < 0,05$). Para el cálculo de la Concentración Letal media, se sometió los resultados a un análisis estadístico con el método paramétrico Probit (con un nivel de confianza del 95%), donde nos mostró el límite superior e inferior y la CL50 a las 48 horas.

En el presente trabajo se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 23, así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2013 (complemento Megastat).

IV. RESULTADOS

4.1. Porcentaje de daño en plantas a las 48 horas

Los vestigios de daño en las hojas y del cogollo en las plantas de maíz después de la aplicación de los tratamientos (Fig. 15), determinó que el 100% de las plantas de maíz registraron daño en el Grupo control, del 68,88 a 83,33% con *H. sp.* y del 53,33 a 76,66% con *H. bacteriophora* (Fig. 14). El análisis de varianza de un factor para el tratamiento con *H. bacteriophora*, demostró que no existieron diferencias significativas ($p=0,089$) entre las concentraciones, en cambio para el tratamiento con *H. sp.*, si existieron diferencias significativas ($p=0,004$) entre las concentraciones aplicadas (Anexo 4). En general el porcentaje de daño en plantas fue del 75 % con *H. sp.*, en comparación a *H. bacteriophora* que obtuvo un 64,18 %.



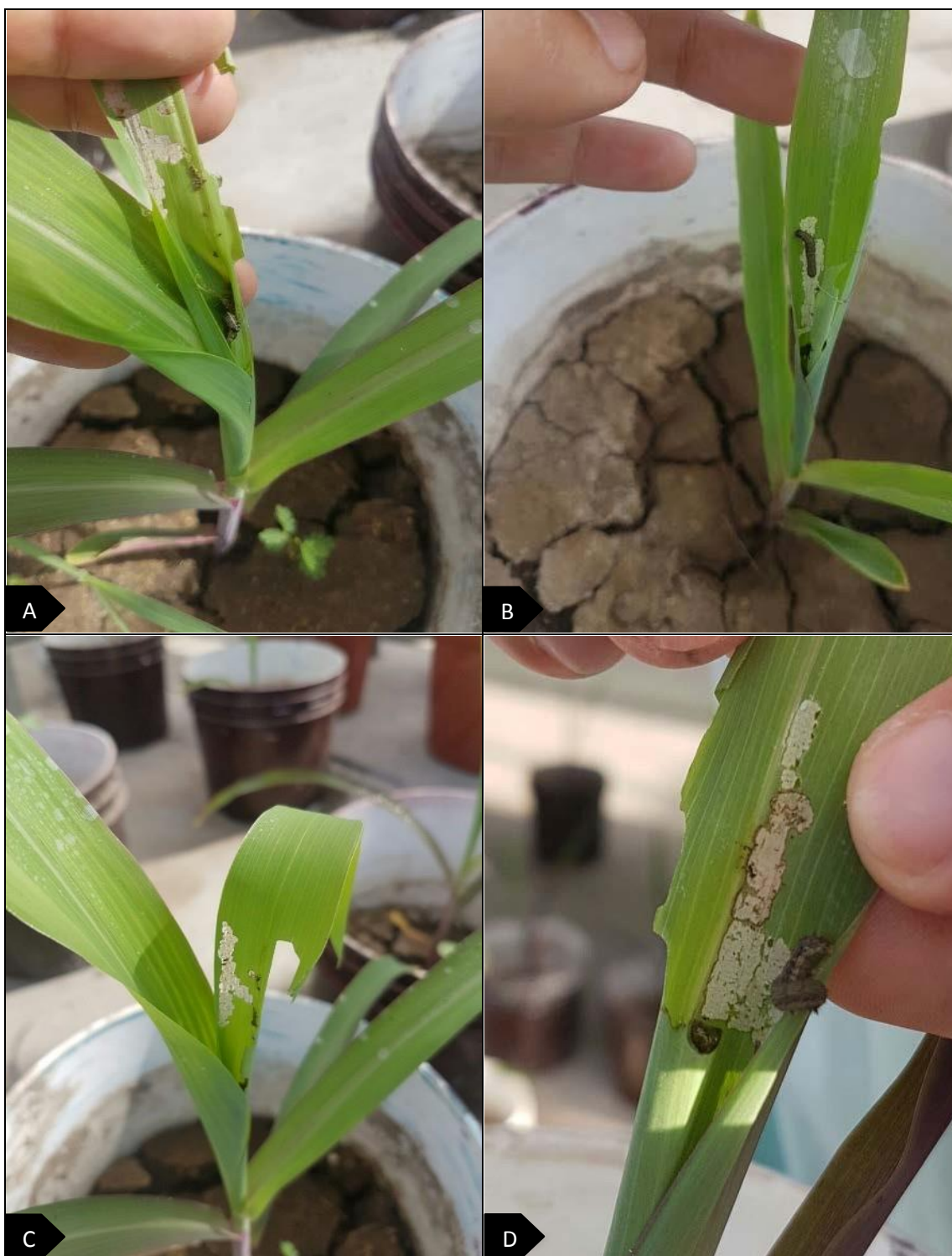


Fig. 15 Muestra de los vestigios de daño en plantas, ocasionado por larvas de cogollero en estadio L3, después de la aplicación de los tratamientos. (A, B, C, D)

4.2. Evaluación de la mortalidad por presencia de los infectivos juveniles en las concentraciones

La observación por estereoscopio de la parasitación efectiva y la presencia de nemátodos, realizado por los tratamientos con *H. bacteriophora* y *H. sp.* (Fig. 16), comprobó que las larvas muertas recolectadas durante las evaluaciones, fueron parasitadas por los infectivos juveniles en cada concentración. El número de nemátodos que se observó en las muestras dependió de la especie y la concentración con la que fue parasitada las larvas de cogollero (Fig. 17 a 24).

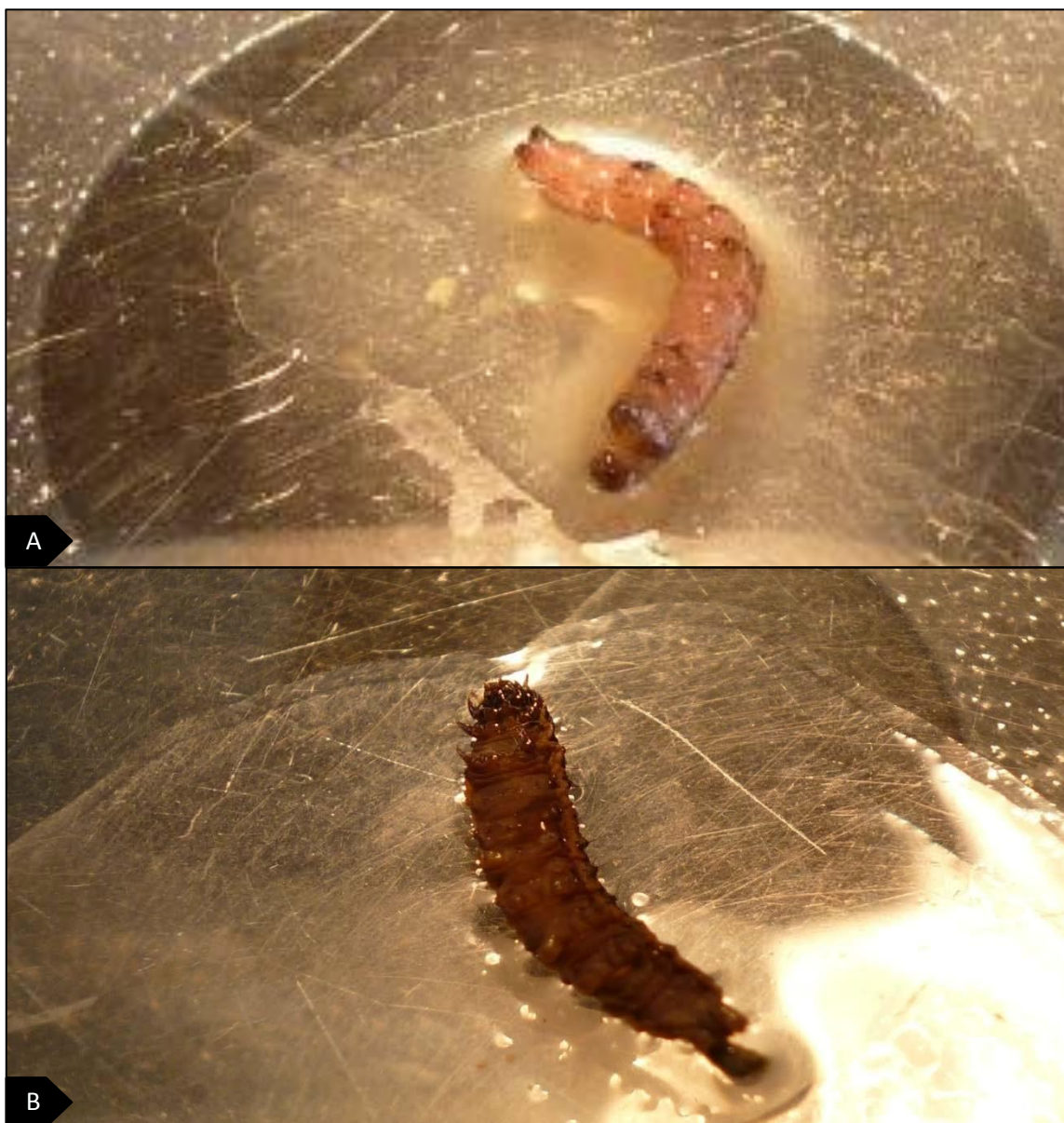


Fig. 16 Parasitación efectiva de las larvas de cogollero visualizadas en estereoscopio, a las 24 y 48 horas de aplicado los tratamientos. (A) Parasitación efectiva con el tratamiento de *Heterorhabditis sp.* (B) Parasitación efectiva con el tratamiento de *H. bacteriophora*.

a. Muestras de la evaluación estereoscópica para *H. bacteriophora*



Fig. 17 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 750 ijs por larva de cogollero.



Fig. 18 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 500 ijs por larva de cogollero.



Fig. 19 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 300 ijs por larva de cogollero.



Fig. 20 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. bacteriophora* en una concentración de 200 ijs por larva de cogollero.

b. Muestras de la evaluación estereoscópica para *H. sp.*



Fig. 21 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 750 ijs por larva de cogollero.



Fig. 22 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 500 ijs por larva de cogollero



Fig. 23 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 300 ijs por larva de cogollero



Fig. 24 Muestra de la observación estereoscópica de la parasitación de *H. sp.*, en una concentración de 200 ijs por larva de cogollero

4.3. Porcentaje de mortalidad de las larvas de cogollero a las 48 horas

Se observó que la mortalidad de las larvas a las 48 horas tuvo un rango de 16,00 a 25,33 larvas muertas para el tratamiento con *H. bacteriophora*, 14,00 a 20,33 larvas muertas con *H. sp.* y ninguna larva muerta para el Grupo control (Fig. 25). Los porcentajes de mortalidad fueron de 53,33 a 84,44 % para *H. bacteriophora* y 46,66 a 67,77 % para *H. sp.* (Tabla 8).

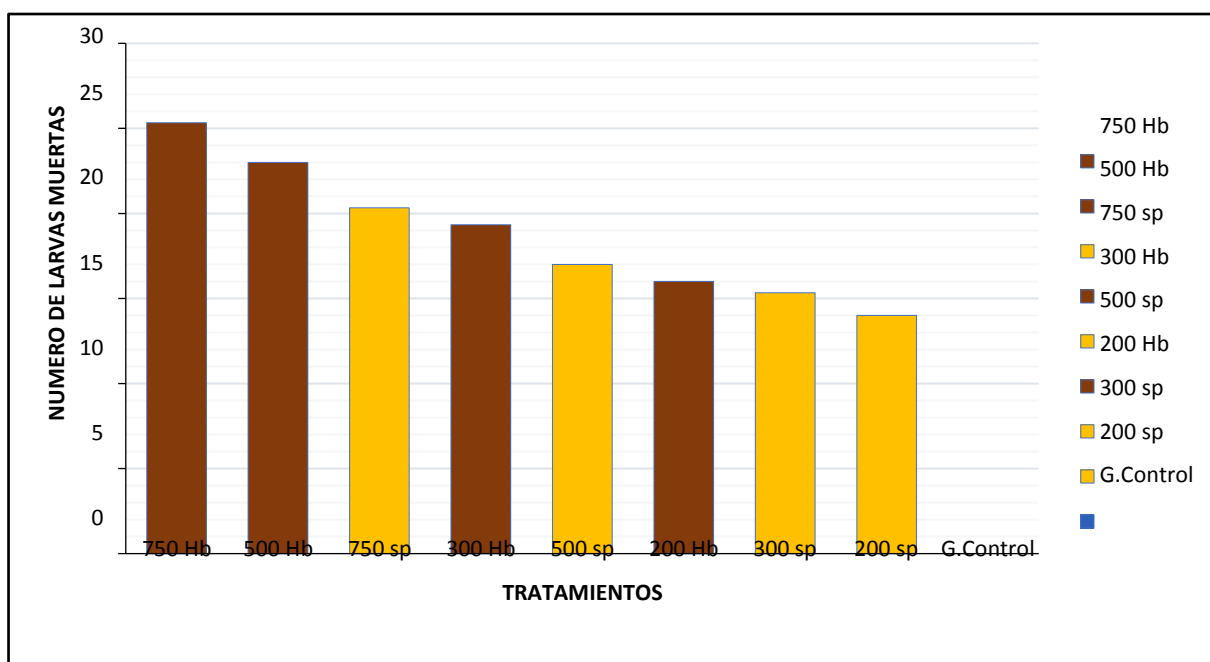


Fig. 25 Media de la cantidad de larvas muertas a las 48 horas después de la aplicación de los tratamientos

Tabla 8

*Porcentaje de Mortalidad de las Larvas de Cogollero de los Tratamientos con *H. bacteriophora* y *H. sp.**

Concentración (ljs/larva)	<i>H. bacteriophora</i>	<i>H. sp</i>
750	84,44 %	67,77 %
500	76,66 %	56,66 %
300	64,44 %	51,11 %
200	53,33 %	46,66 %

Según el análisis de varianza y prueba HSD Tukey de un solo factor (Anexo 5, 6 y 7), para *H. bacteriophora*, las concentraciones de 200 con 300, 300 con 500 y 500 con 750 ljs/larva, no se diferenciaron significativamente en cada grupo (Tabla 9), pero para el tratamiento con *H. sp.*, la concentración de 750 ljs/larva, se diferenció significativamente del resto de concentraciones, no presentando diferencias significativas las concentraciones de 200 con 300 y 300 con 500 ljs/larva en cada grupo (Tabla 10).

Tabla 9

Prueba HSD Tukey del Promedio de Larvas Muertas del Tratamiento con H. bacteriophora

Concentración (ljs/larva)	Promedio	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
200	16,00	a		
300	19,33	a	b	
500	23,00		b	c
750	25,33			c

Tabla 10

Prueba HSD Tukey del Promedio de Larvas Muertas, a las 48 horas de la Aplicación del Tratamiento con H. sp.

Concentración (ljs/larva)	Promedio	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
200	14,00	a		
300	15,33	a	b	
500	17,00		b	
750	20,33			c

En conclusión el análisis de varianza para la mortalidad de ambos tratamientos mostró alta significancia ($p=0,005$) (Anexo 8). Registrándose la mayor mortalidad con *H. bacteriophora* en la concentración de 750 ljs/larva, con una media de 25,33 larvas muertas (Fig. 25) y un porcentaje de mortalidad de 84,44% (Tabla 8). La menor mortalidad se alcanzó con *H. sp.*, en la concentración de 200 ljs/larva, con una media de 14 larvas muertas (Fig. 25) y un porcentaje de mortalidad de 46,66% (Tabla 8). Según la prueba de comparación simultanea de Tukey para ambos tratamientos, nos mostró que la concentración de 750 ljs/larva con *H. bacteriophora*, registró diferencias altamente significativas con el resto de concentraciones de ambos tratamientos, mientras que la concentración de 200 ljs/larva con *H. sp.*, no se diferenció significativamente de las concentraciones de 300 ljs/larva de *H. sp.*, y 200 ljs/larva de *H. bacteriophora* (Tabla 11) (Anexo 9).

Tabla 11

Prueba de Comparación simultánea de Tukey de los Tratamientos con H. bacteriophora y H. sp.

Concentración (ljs/larva)	Promedio	1	2	3	4	5
200 sp	14,00	a				
300 sp	15,33	a	b			
200 Hb	16,00	a	b			
500 sp	17,00		b			
300 Hb	19,33			c		
750 sp	20,33			c		
500 Hb	23,00				d	
750 Hb	25,33					e

Para las repeticiones que se hicieron del ensayo, el análisis de varianza demostró alta significancia ($p=0,000$) (Anexo 8). Se observó que el tratamiento con *H. bacteriophora*, presentó una mayor cantidad de larvas muertas, durante la primera repetición (Junio) para las concentraciones que se aplicaron: 200, 300, 500 y 750 ljs/larva. En cambio, para el tratamiento con *H. sp.*, la mayor cantidad de larvas muertas que se registró, varió en cada repetición (durante la primera repetición (Junio) se registró para 750 ljs/larva y en la segunda repetición (Julio) para 200 y 300 ljs/larva); a excepción de la concentración de 500 ljs/larva, donde la cantidad de larvas muertas registradas se mantuvo igual durante todas las repeticiones (Fig. 26).

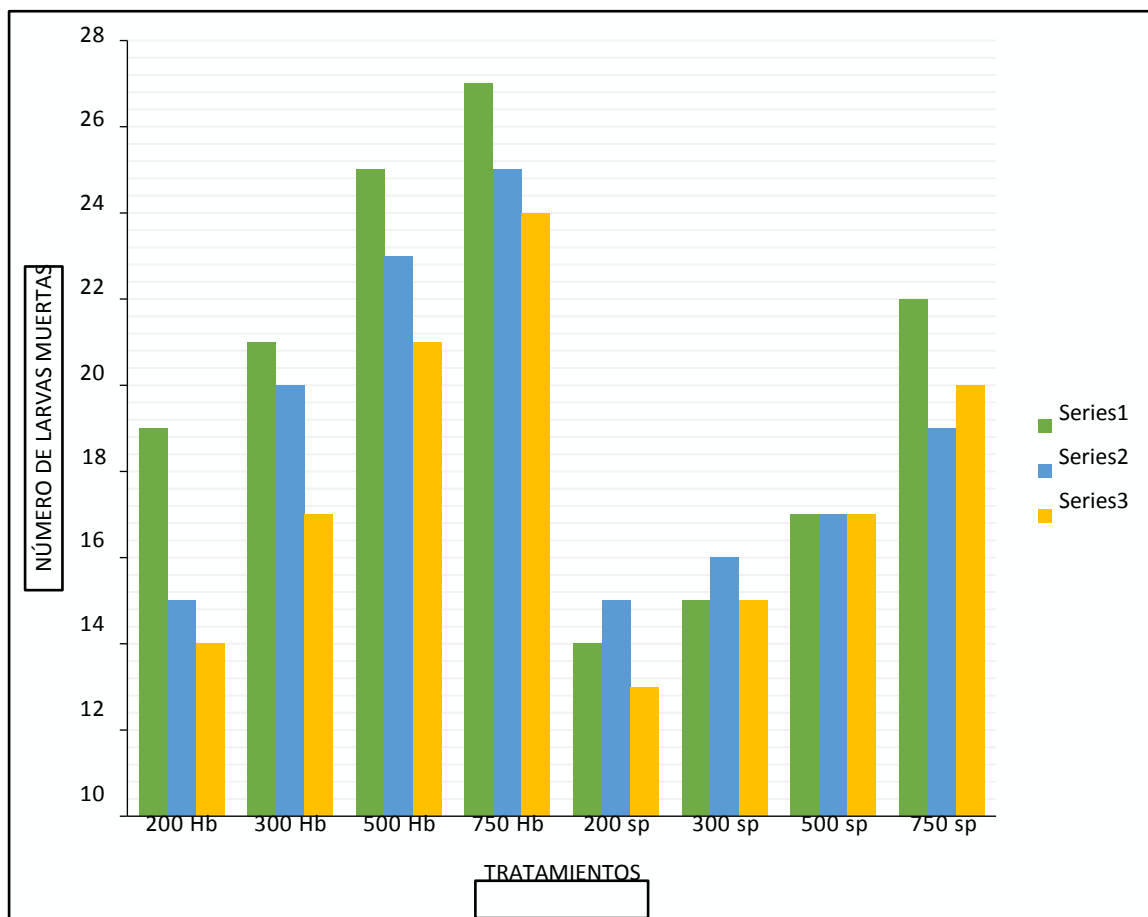


Fig. 26 Variación de la cantidad de larvas muertas de cogollero que se registró en cada repetición de los tratamientos (*H. bacteriophora* y *H. sp.*).

4.4. Determinación de la Concentración Letal Media (CL50)

Se realizaron los cálculos a las diferentes concentraciones de los tratamientos, mediante el análisis estadístico Probit a un 95% de confianza. Para el tratamiento con *H. bacteriophora*, la Concentración Letal Media a las 48 horas (CL50-48) fue 182,58 ljs/larva, alcanzando un límite superior de 271,62 y un límite inferior de 40,27 ljs/larva (Tabla 12) (Anexo 11), determinando que la CL50 tuvo un incremento constante a partir del segundo y tercer ensayo (Fig. 27).

Tabla 12

Carta de Prueba CL50 con el Tratamiento de H. bacteriophora

Mes	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
Junio	132,25	9,44	216,72
Agosto	185,01	39,69	272,05
Septiembre	230,48	71,66	326,09
Promedio	182,58	40,27	271,62

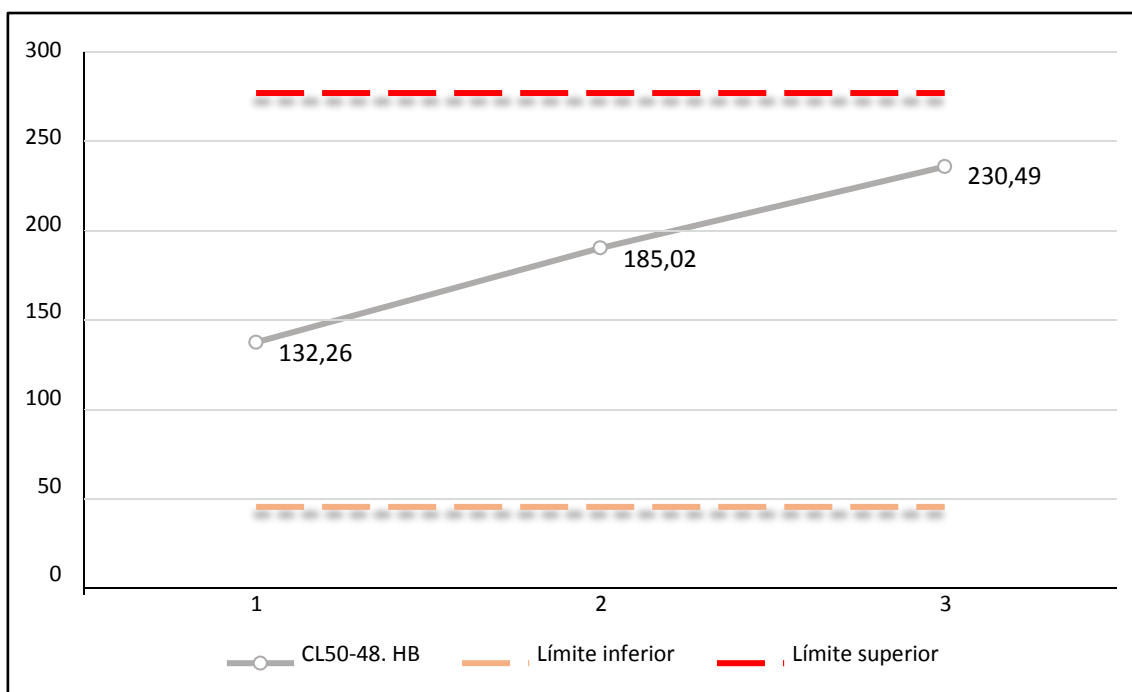


Fig. 27 Variación de la Prueba de CL50-48 durante los ensayos, para el tratamiento con *H. bacteriophora*.

Para el tratamiento con *Heterorhabditis sp.*, la concentración letal media a las 48 horas (CL50-48) fue 262,68 ljs/larva, alcanzando un límite superior de 640,56 y un límite inferior de 75,17 ljs/larva (Tabla 13) (Anexo 12), determinando que la CL50 durante el segundo ensayo tuvo una notoria disminución, en comparación al primer y tercer ensayo (Fig. 28).

Tabla 13

Carta de prueba CL50 con el tratamiento de H. sp.

Mes	CL50-48	Límite inferior	Límite superior
Junio	273,48	4,94	493,79
Agosto	211,80	50,45	889,02
Septiembre	302,76	170,10	538,87
Promedio	262,68	75,17	640,56

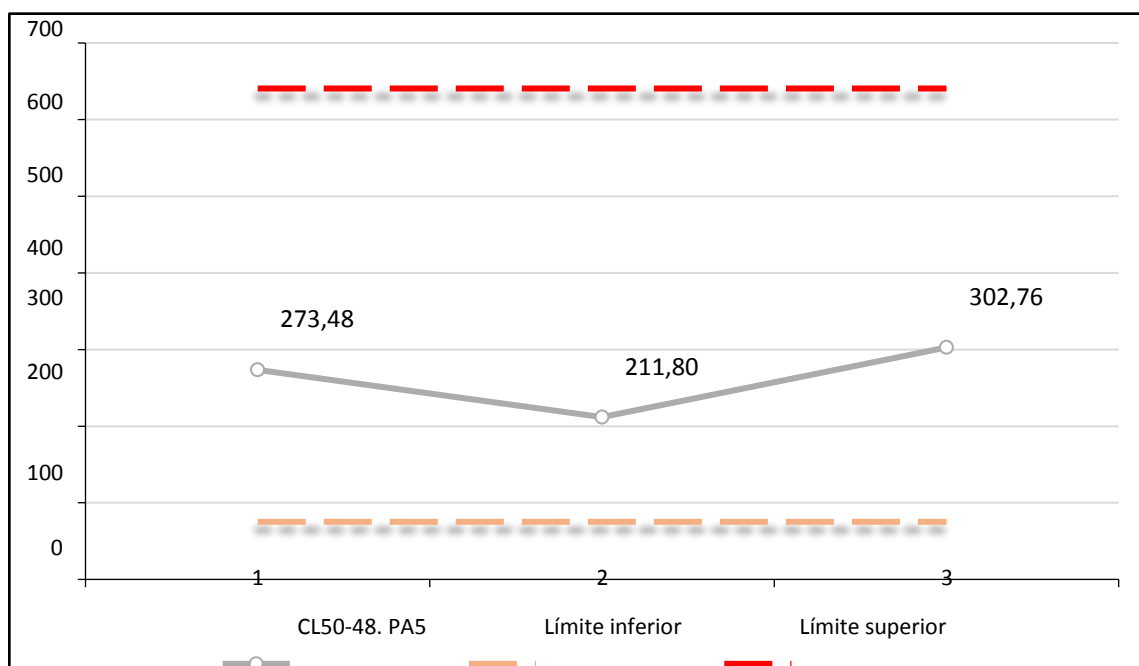


Fig. 28 Variación de la Prueba de CL 50-48 durante los ensayos, para el tratamiento con *H. sp.*

Como punto final se deduce que el mejor tratamiento para el control de larvas de cogollero *S. frugiperda* en tercer estadio, se realiza con el nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*. Ya que necesitó menor cantidad de infectivos juveniles durante los ensayos, para matar el 50% de las larvas a las 48 horas de aplicar los tratamientos (Fig. 29).

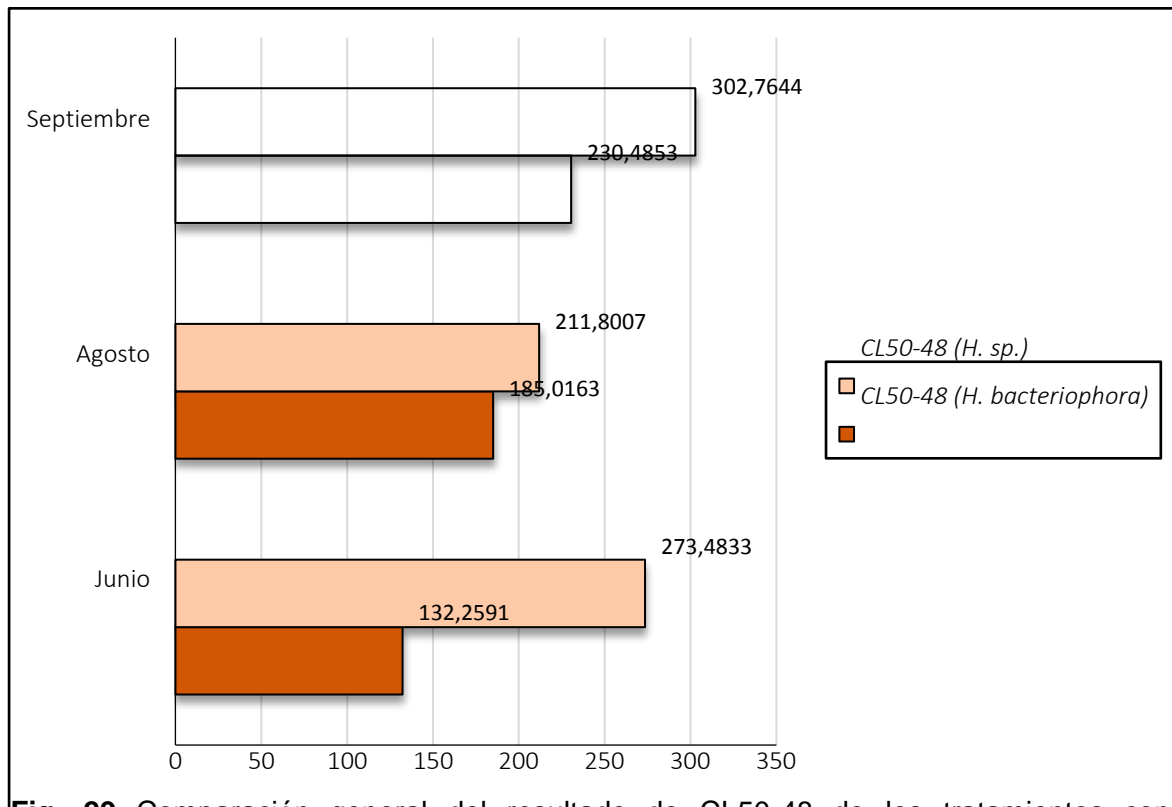


Fig. 29 Comparación general del resultado de CL50-48 de los tratamientos con *H. bacteriophora* y *H. sp.*

V. DISCUSIÓN

El uso de nemátodos entomopatógenos es y será uno de muchos métodos biológicos para combatir plagas de lepidópteros y otros tipos de insectos plaga. La presente investigación ha permitido no solo determinar la concentración letal media de ambas especies ante la plaga de cogollero en maíz, si no que ha combinado metodologías de otras investigaciones para una eficaz aplicación. El uso de nemátodos entomopatógenos se fundamenta porque poseen una gran capacidad de adaptación a nuevos ambientes, a condiciones adversas, resistencia a productos químicos, alta especificidad por insectos, inocuidad al ambiente y mamíferos, y compatibilidad con otros entomopatógenos (Sáenz A., 2005). Cabe resaltar que las especies de nemátodos del género *Heterorhabditis* tienen una característica particular, que les permite tener una mayor infectividad con respecto a otros, esto debido a la presencia de una estructura cefálica a modo de púa en los infectivos juveniles (Abdel-Razek & Abd-Elgawad , 2007), la cual les brinda una vía adicional de entrada al insecto, ya que además de penetrar a través de las aberturas naturales, también pueden hacerlo perforando la cutícula (Chacón Chausá , 2011)

En el transcurso de la presente investigación se hace mención a factores que influyeron directamente en este, por tal motivo se plantearon soluciones para estas:

La temperatura, es uno de los factores que pudo alterar directamente los resultados de la investigación, ya que influye negativamente en la actividad parasítica de los nemátodos. Según Nguyen y Smart (1992), reportan que temperaturas superiores de 35°C a 37°C interrumpen el ciclo de vida del nemátodo, siendo la óptima 24°C. Así mismo en experimentos de laboratorio usando *Galleria mellonella* como huésped, el desarrollo de *H. bacteriophora* varió entre 10 a 32 °C por infección o mortalidad, 15 a 32 °C para el

establecimiento (nematodos que ingresan al huésped) y 15 a 30 °C para la reproducción nemátodo en el host (VKM, 2014). Por tal motivo se planteó que no se debía realizar las aplicaciones de los tratamientos en las mañanas o al medio día, porque la temperatura para el día establecido de aplicación en invernadero alcanzaba de 37,5°C a 42,2°C (dependiendo del mes en que se realizó cada ensayo). Por lo tanto, se estableció que las aplicaciones se hicieran a las 18:00 horas, pues a esta hora se registraba una temperatura ideal para la parasitación, la que oscilaba entre 23,6°C a 30°C.

El factor de la desecación sobre la supervivencia de los nemátodos durante la parasitación fue también un factor negativo; por lo tanto, se nos hizo necesario la utilización de una solución de Agar Nutriente al 0.1% (rango de ph de 7 – 8), el cual según Hussein *et al.* (2012), permite la adherencia a los infectivos juveniles en las plantas y puede mantenerlos viables para parasitar las larvas de cogollero. Reportes establecidos por Cajusol y Requejo (2016), nos muestran que con una concentración de 1 gr de agar nutritivo por cada litro, se logra la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp.* Nativa en 76,6% - 86,6% respectivamente, hasta los 30 días de almacenamiento. Indicando que el agar nutritivo mantiene la viabilidad de los nemátodos por periodos más largos de tiempo y evita la resequedad de la solución de los nemátodos entomopatógenos sobre las plantas. Hay que tener en cuenta que factores como la humedad, el tipo de suelo, las condiciones ambientales y el modo de aplicación también pueden afectar la acción de la infectividad de los nemátodos (Garcia, Raetano, & Leite, 2008).

Es importante recalcar que los resultados obtenidos de la investigación se recopilaron a las 48 horas porque según Bennett y Ciarke (2005), los nemátodos entomopatógenos guardan una relación mutualista con un simbiote bacteriano del género *Photorhabdus luminiscens* (Enterobacteriaceae) que alojan en su intestino, la cual les permite matar a su hospedero durante las primeras 24 a 48 horas después de la infección. Por tal motivo se discute los resultados en los siguientes acápite:

En el parámetro de daño en las plantas de maíz, producido por las larvas de cogollero, 48 horas después de la aplicación, se pudo observar que el tratamiento con *H. bacteriophora* registró un promedio de 64,18%, *H. sp* un 75% y el grupo control un 100% de daño en plantas, estos resultados nos indican que durante el tiempo en que se realiza la infestación, hasta antes de la mortalidad, las larvas del tercer estadio de *S. frugiperda* pueden llegar a producir daños severos en el cultivo.

Para el número de larvas muertas por los tratamientos, se estableció que el mayor porcentaje de mortalidad fue con el tratamiento *H. bacteriophora* con un 53,33 a 84,44 %, a comparación de *H. sp*, que obtuvo un porcentaje de mortalidad de 46,66 a 67,77 %, en las concentraciones de 200 a 750 Ijs/larva. Estos resultados son similares a los reportados por Castellanos (2000), quien en condiciones de laboratorio a las 72 horas, estudió el parasitismo de los nemátodos entomopatógenos *H. bacteriophora* (HC1) y *Steinernema sp.* (SC1) sobre varias especies del Orden Homóptera, determinando que *H. bacteriophora* alcanza un 80% de mortalidad. Resultados menores fueron obtenidos por Carvajal Armijo (2009), el cual menciona que trabajando a nivel de laboratorio con Picudo *Metamasius hemipterus* frente al nemátodo *H. bacteriophora*, produjo el 35% de mortalidad con la dosis de 1000 juveniles/ picudo.

También se pudo establecer que el rango de sensibilidad al 50% difiere para cada especie de nemátodo, determinándose que *H. sp.* tiene un rango de sensibilidad de 200 a 300 Ijs/larva, y *H. bacteriophora* tiene un rango menor o igual de 200 Ijs/larva. Valores que se compararon con Andaló *et al* (2010), quienes determinaron que la concentración de 200 IJs/larva es ideal para las pruebas en invernadero. Pruebas realizadas en campo por Casusol y Neira (2011), en larvas de cogollero con *H. bacteriophora*, nos muestran mortalidades de 16.2% y 23.86 %, en las concentraciones de 200 y 300 NEP/ml, respectivamente. También en pruebas realizadas en laboratorio con *C. sordidus*, con el tratamiento de *H. bacteriophora*, mostraron que el porcentaje de mortalidad alcanzó 40% y 43%, en las concentraciones de 150 y 387 NEP/insecto (Morales Ramírez, 2012). Gracias a esto se pudo inferir que a partir de la concentración de 200 Ijs/larva, esta es ideal para realizar los ensayos en invernadero y comprobar lo expuesto por otros investigadores.

Para determinar la concentración letal media a las 48 horas, se sometió a un análisis probit, resultando que la CL50-48 para el tratamiento con *H. bacteriophora* fue 182,58 ijs/larva y para *H. sp.*, fue 262,68 ijs/larva. Resultados mayores fueron obtenidos por Morales Ramírez (2012), quien en condiciones de laboratorio obtuvo una CL50 a los 15 días de 1220.4 nemátodos/insecto, con el Picudo del banano *C. sordidus* frente a diferentes concentraciones de *H. bacteriophora*. Esto nos indica que *S. frugiperda* es una plaga con mayor susceptibilidad a este género de nemátodo entomopatógeno.

Se muestra también que durante los ensayos, *H. bacteriophora* tuvo un incremento constante de CL50 a partir del segundo y tercer ensayo. Caso contrario se produjo para *H. sp.*, el cual mostró que durante el segundo ensayo tuvo una notoria disminución de CL50, en comparación al primer y segundo. Esto se puede explicar debido quizá a las fluctuaciones de temperatura que se registraban, ya que después de la aplicación durante el día, esta no se mantenía estable y pudo influir directamente en la acción parasítica y reproducción de infectivos juveniles (VKM, 2014). La calidad de la cepa también pudo ser un factor importante para la infestación, ya que el volumen de las soluciones varió para cada ensayo y fue diferente, tanto para cada especie como para las concentraciones obtenidas.

Al final de la investigación se deduce que el mejor tratamiento para el control de larvas de cogollero en tercer estadio, se realiza con el nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*. Ya que necesitó menor cantidad de infectivos juveniles durante los ensayos, para matar el 50% de las larvas a las 48 horas de aplicar los tratamientos. Esta deducción nos demuestra que las especies de nemátodos utilizadas en la presente investigación, presentan variabilidad entre ellas, ya que la temperatura ideal para cada nemátodo puede ser diferente, como ya lo hemos señalado anteriormente; u otro razonamiento sería que su patogenicidad varíe con el tipo de plaga al cual se le exponga y a la concentración sometida, ya que hay estudios como el de Rosero (2011), el cual nos manifiesta que la mortalidad para cada estado ninfal de *Aeneolamia varia* varía entre las especies de nemátodos y responde diferencialmente con el incremento de la dosis (100 y 1500 IJ/cm²).

Por consiguiente nuestra investigación queda abierta a la experimentación en campo con presencia natural de la plaga para validar los resultados y evaluar la relación económica (costo: beneficio) del uso de entomopatógenos en la producción de maíz.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ La concentración Letal media a las 48 horas (CL50-48) sobre las larvas de *S. frugiperda* en estadio L3, para *H. bacteriophora* fue 182,58 ljs/larva y para *H. sp.* fue 262,68 ljs/larva (ambas concentraciones establecidas dentro sus límites, respectivamente).
- ✓ Se determinó que el daño en las planta de maíz es inversamente proporcional a la concentración de los infectivos juveniles que se aplicaron sobre las larvas de *S. frugiperda* en estadio L3, registrándose a las 48 horas un porcentaje de daño en plantas para *H. bacteriophora* de 53,33 a 76,66% y para *H. sp.* un porcentaje de 68,88 a 83,33%. El Grupo control presentó el 100 % de daño en las plantas de maíz.
- ✓ Con respecto al porcentaje de mortalidad a las 48 horas de las larvas de *S. frugiperda* en estadio L3, se determinó que existen algunas diferencias significativas para las concentraciones entre los tratamientos, y que *H. bacteriophora* produjo una mortalidad de 53,33 a 84,44 %, mientras que *H. sp.* produjo una mortalidad de 46,66 a 67,77 %. Resultando que la mayor mortalidad se alcanzó con la concentración de 750 ljs/larva de *H. bacteriophora* (media de 25,3 larvas muertas) y la menor mortalidad se alcanzó con 200 ljs/larva de *H. sp.* (media de 14 larvas muertas). El grupo control no presentó mortalidad de larvas.
- ✓ Se establece que el mejor nemátodo para el control de larvas de cogollero *S. frugiperda* en estadio L3 en las plantas de maíz en invernadero, fue *H. bacteriophora*.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Los resultados obtenidos con respecto a la CL50 en invernadero, deben ser aplicados en campo para contrastar la investigación.
- ✓ Es conveniente controlar factores externos (insectos y roedores) frente a la realización de pruebas, esto con el fin de que agentes ajenos a la investigación, modifiquen o alteren el resultado esperado.
- ✓ Se deben asegurar condiciones óptimas como la temperatura y ventilación en el invernadero, para evitar cualquier cambio y alteraciones en los organismos utilizados para las pruebas.
- ✓ Se considera necesario utilizar una sola área exclusiva del laboratorio de bioensayos para *Spodoptera frugiperda* y otra área para los nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis sp.* y *H. bacteriophora*), para evitar alteraciones durante la crianza.

VIII. RESUMEN

Con el propósito de determinar la concentración letal media de los nemátodos entomopatógenos: *Heterorhabditis* sp. y *H. bacteriophora* para el control de larvas en estadio L3 de cogollero *S. frugiperda* en plantas de maíz, se hizo un bioensayo en el invernadero del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) (Sede Vista Florida, Lambayeque), utilizando tres tratamientos: (T0) Grupo Control, T1 (*Heterorhabditis* sp.) y T2 (*H. bacteriophora*). Para T1 y T2 se utilizó cuatro diferentes concentraciones de infectivos juveniles (Ijs) (200, 300, 500 y 750 Ijs/larva/planta); menos para T0 (0 Ijs/larva/planta). Cada concentración por tratamiento tuvo a 30 larvas de cogollero como unidad experimental, teniendo como población 270 larvas en tercer estadio, a las cuales se les aplicó las soluciones de Infectivos juveniles (Ijs), que se calculó por concentración, en invernadero. Las evaluaciones se realizaron a las 48 horas, y se registró: el porcentaje de daño en plantas, porcentaje mortalidad y finalmente se calculó la CL50. Los resultados obtenidos, establecieron que el mejor nemátodo para combatir las larvas de cogollero en tercer estadio fue *H. bacteriophora*, ya que obtuvo menor porcentaje de daño en planta (53,33%) y pudo alcanzar la mayor mortalidad (84,44%) en una concentración de 750 Ijs/larva, diferenciándose notoriamente del resto de concentraciones de los tratamientos. Para el tratamiento con *H. sp.*, se observó el mayor porcentaje de daño en planta (83,33%) y la menor mortalidad (46,66%) en una concentración de 200 Ijs/larva, no diferenciándose significativamente de 300 Ijs/larva del mismo tratamiento y de la concentración de 200 Ijs/larva del tratamiento con *H. bacteriophora*. El G. Control presentó 100% de daño en planta y no presentó mortalidad. Al someter los resultados a un análisis Probit al 95%, se determinó que la CL50-48 para *H. bacteriophora* fue 182,58 Ijs/larva y para *H. sp.*, fue 262,68 Ijs/larva.

Abstract

In order to determine the mean lethal concentration of entomopathogenic nematodes: *Heterorhabditis* sp. and *H. bacteriophora* for the control of L3 stage larvae of *S. frugiperda* cogollero in corn plants, a bioassay was made in the greenhouse of the National Institute of Agrarian Innovation (INIA) (Vista Florida Headquarters, Lambayeque), using three treatments: (T0) Control Group, T1 (*Heterorhabditis* sp.) and T2 (*H. bacteriophora*). For T1 and T2, four different concentrations of juvenile infectives (Ijs) were used (200, 300, 500 and 750 Ijs / larva / plant); less for T0 (0 Ijs / larva / plant). Each concentration per treatment had 30 cogollero larvae as an experimental unit, having as a population 270 larvae in the third stage, to which the solutions of juvenile Infectives (Ijs), which were calculated by concentration, were applied in the greenhouse. The evaluations were made at 48 hours, and the percentage of damage in plants, mortality percentage was recorded and finally the LC50 was calculated. The results obtained, established that the best nematode to fight the larvae of cogollero in third stage was *H. bacteriophora*, since it obtained lower percentage of damage in plant (53.33%) and could reach the highest mortality (84.44%) in a concentration of 750 Ijs / larva, differing markedly from the rest of the concentrations of the treatments. For the treatment with *H. sp.*, The highest percentage of damage was observed in the plant (83.33%) and the lowest mortality (46.66%) in a concentration of 200 Ijs / larva, not significantly different from 300 Ijs / larva of the same treatment and the concentration of 200 Ijs / larva of the treatment with *H. bacteriophora*. The G. Control presented 100% damage in plant and did not present mortality. When the results were subjected to a 95% Probit analysis, it was determined that the LC50-48 for *H. bacteriophora* was 182.58 Ijs / larva and for *H. sp.*, It was 262.68 Ijs / larva. Key words: Entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* sp. And *H. bacteriophora*), cogollero *S. frugiperda*, LC50-48.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andaló , V., Santos, V., Furtado M., G., Costa M., C., & Moino J., A. (2010). Avaliação de nematoides entomopatogênicos em condições de laboratório e casa-de-vegetação visando ao controle de *Spodoptera frugiperda*. *Ciência Rural*, 40(9), 1860-1866. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000151>
- Abdel-Razek , A., & Abd-Elgawad , M. (2007). Investigations on the efficacy of entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Biosd.) and *Galleria mellonella* (L.). *Phytopathology Plant Protection*, 40(6), 414-422.
- Adams, B., & Nguyen, K. (2002). Taxonomy and systematics. En R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (págs. 1-33). Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing.
- Arteaga A., N. M. (2015). *Evaluación de la reproducción masiva de nematodos entomopatógenos (Steinernema spp y Heterorhabditis spp) en larvas de gallina ciega (Phyllophaga spp) bajo condiciones controladas*. (Tesis de grado), Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias, Quevedo, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1286/1/T-UTEQ-0009.pdf>
- Baca Choque, Y. (2012). *Eficacia parasítica del nemátodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora sobre el control de larvas de Spodoptera frugiperda “cogollero del maíz” en Zea mayz “maíz” var. marginal bajo condiciones de campo*. (Tesis grado de licenciatura), Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas, Lambayeque, Perú.
- Bedding , R., & Molyneux , A. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (*Heterorhabditidae*: *Nematoda*). *Nematologica*(28), 354-359.
- Bennett, H., & Ciarke, D. (2005). The pbgPE operon in *Photobacterium luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *Journal of Bacteriology*(187), 77-84.

- Cajusol Velis, M., & Requejo Sánchez, L. (2016). *Conservación de nemátodos entomopatógenos (Heterorhabditis bacteriophora y Heterorhabditis sp., nativa) en tres sustratos a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, en laboratorio. Junio 2015 - Enero 2016*. Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento académico de Biología / Microbiología y Parasitología, Lambayeque, Perú.
- Carvajal Armijo, O. (2009). *Control del picudo del plátano Cosmopolites sordidus Germar (Coleóptera, Curculionidae) por el nematodo Heterorhabditis bacteriophora (Heterorhabditidae)*. Tesis de grado, Universidad Zamorano, Carrera de ciencia y producción agropecuaria, Zamorano, Honduras. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/362/1/T2743.pdf>
- Castellanos López, L. (2000). "Efectividad de los nematodos entomopatógenos Heterorhabditis bacteriophora (HC1) y Steinernema sp. (Sc1) en el control de insectos del orden Homoptera (pulgonos, cóccidos y moscas blancas), en condiciones de laboratorio". *Centro Agrícola*, 27(1), 25-30.
- Castillo, J., Buendia, O., Alcazar, J., & Rosales. (2006). *Aislamiento y Patogenicidad del Nematodo Heterorhabditis Spp en el suelo De Esparrago en la Irrigación De Chavimochic*. Universidad Agraria de la Molina y Centro Internacional de la Papa.
- Casusol , C., & Neira, M. (2011). Efecto del nematodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora para el control de Spodoptera frugiperda y gusanos de tierra en maíz. *Libro de resúmenes de la LIII Convención Nacional de Entomología* .
- Chacón Chausá , A. (2011). *"Evaluación de la efectividad de nematodos entomopatógenos para el control biológico del gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax Hustache), (Coleoptera: Curculionidae), San Gabriel, Provincia del Charchi"*. Tesis de grado, Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica, El Ángel - Charchi. Ecuador.
- Chango Amaguaña, L. (2012). *Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas*. (Tesis de grado), Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica, Ambato, Ecuador. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3174/1/Tesis-33agr.pdf>

- Ciche, T., & Ensing, J. (2003). For the insect pathogen *Photobacterium luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied Environmental Microbiology*(69), 1890-1897. Obtenido de <http://aem.asm.org/content/69/4/1890.full>
- Córdova Neyra, M., & Pérez Tesén, E. (2010). *Potencial Biocontrolador de Nemátodos Entomopatógenos Nativos (Rhabditida) sobre Agrotis sp. (Lepidoptera: Noctuidae) en Laboratorio*. Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Departamento de Biología, Lambayeque.
- Dowds, B. C., & Peters, A. (2002). Virulence mechanisms. En R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic nematology* (págs. 79-98). New York, EE.UU: CABI.
- DuPont Pioneer. (s.f.). Manejo de gusano cogollero en cultivo de maíz. 4. Obtenido de https://www.pioneer.com/CMRoot/international/Argentina_Intl/AGRONOMIA/MANEJO_DE_GUSANO_COGOLLERO_EN_MAIZ.pdf
- Ehlers, R.-U. (2003). Biocontrol nematodes. En H. Hokkanen, & A. Hajek (Edits.), *Environmental Impacts of microbial Insecticides* (págs. 177-220). Kluwe Academy Publishers.
- Galarza, M. (1996). *Aumente su cosecha de maíz en la Sierra*. Quito, Ec. Estación Experimental "Santa Catalina".
- García N., G., & Tarango R., S. H. (2009). *Manejo biorracional del gusano cogollero en maíz*. Folleto técnico, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Chihuahua, México.
- García, L. (1997). Control biológico de *Spodoptera frugiperda*. *Trillas*, pp. 89,90.
- Garcia, L., Raetano, C., & Leite, L. (2008). Tecnologia de aplicação para os nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (*Rhabditida: Heterorhabditidae* e *Steinernematidae*) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) na cultura do milho. *Neotropical Entomology*, 37(3), 305-311. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2008000300010>.
- González Ramírez, M. (1995). *Susceptibilidad de *Mocis latipes* (Guenée) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), al Nematodo Entomopatógeno *heterorhabditis bacteriophora* Pionar (Rhabditida: Heterorhabditidae)*. (Tesis de maestría), Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, México. Obtenido de http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Martin%20Gonzalez%20Ramirez.pdf

- Goode, W., & Hatt, P. (1986). *Métodos de Investigación Social* (Décima cuarta ed.). México: Trilla.
- Hussein, H., Adel, M., & Gelbic, I. (2012). Efectividad del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* en formulaciones de gel agar contra larvas el Escarabajo de la Patata Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Cent. Eur. J. Biol.*, 7(1), 77-82.
- ILSI Argentina. (2006). Maíz y Nutrición: Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. *Maizar*, 2, 80. Obtenido de <http://www.maizar.org.ar/pdf/Revista%20maizar%202.pdf>
- Injante, P., & Joyo, G. (2010). *Manejo integrado de maíz amarillo duro*. Curso - Taller, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Libertad, Perú.
- Kaya, H., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *review of entomology*, 38, 181-206.
- Koppenhöfer, A. (2007). Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. En K. Nguyen, & D. Hunt (Edits.), *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (págs. 735-808). Brill, Leiden, Holanda: Nematology Monographs and Perspectives.
- Koppenhöfer, A. M., & Fuzy, E. M. (2008). Effect of the anthranilic insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida:Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological control*, 45, 93 - 102.
- Marrero, M. (2006). *Nematodos entomopatógenos (Heterorhabditis spp.) para el control de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith), Plutella xylostella (Linnaeus.) y Heliothis virescens (Fabricius)*. Universidad Central Marta Abreu, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Obtenido de agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2009100913
- Martinez, A., & Tico, L. (1997). *Fertilizantes agrícolas*. Barcelona: Acribia.
- Mc Graw, B., & Koppenhöfer, A. (2008). valuation of two endemic and five commercial entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) against annual bluegrass weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. *Biological Control*, 46, 467-475.

- Meighen, E. A., & Szittner, R. B. (1992). Multiple repetitive elements and organization of the lux operons of luminescent terrestrial bacteria. *Journal of Bacteriology*(174), 5371-5381.
- Merino, & France. (2009). *Nematodos Entomopatógenos: Control Biológico de insectos plaga de importancia económica*. INIA Quilamapu, Chile. Obtenido de www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR35946.pdf
- Morales Ramírez, F. (2012). *Estimación de la concentración y tiempo letal del nemátodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control de Cosmopolites sordidus (Coleóptera: Curculionidae)*. Tesis de grado, Universidad Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/727/1/T2442.pdf>
- Nguyen , K., & Smart, G. (1992). Steinernema neocurtillis n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and key to species of the genus Steinernema. *Journal of Nematology*, 24(4), 463-477. Obtenido de <http://journals.fcla.edu/jon/article/viewFile/66425/64093>
- Ortiz, F. (2010). *Diccionario de especialidades agroquímicas*. Quito, Ecuador: Thomson PLM del Ecuador S.A.
- Pardo, L., Montoya , J., Schoonhoven, A., & Belloti, C. (2005). Structure and composition of the white grub complex (Coleóptera: Scarabaeidae) en agroecological systems of northern Cauca, Colombia. *Florida Entomol.*, 88(4), 355-363.
- Parsa , S., Alcázar, J., Salazar, J., & Kaya, K. (2006). An indigenous Peruvian entomopathogenic nematode for suppression of the Andean potato weevil. *Sciencedirect, Biological Control*, 39, 171-178.
- Peters, A., & Ehlers, R. U. (1994). Susceptibility of leather jackets (tipula paludosa and tipula oleracea; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode Steinernema feltiae. *Journal of Invertebrate Pathology*(63), 163-171.
- Pionar, G. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En R. Gaugler , & H. Kaya (Edits.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pág. 54). B. Raton, Florida: CRC Press.
- Poinar , J., Thomas, G., Haygood, M., & Nealson, K. (1980). Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode Heterorhabditis bacteriophora. *Soil Biology and Biochemistry*(12), 5-10.

- Rodríguez R., D., Pereira V., J., & Pérez V., N. (2014). Producción y calidad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) Cepa CH1 en el CREE Ciro Redondo, Ciego de Ávila, Cuba. *Granma Ciencia*, 18(2). Obtenido de www.grciencia.granma.inf.cu/vol%2018/2/2014_18_n2_a4.pdf
- Rosero Guerrero, M. (2011). *Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, Aeneolamia vari (F) (Hemiptera:Cercopidae)*. Tesis de postgrado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/11056277.pdf>
- Ritchie, S., Hanway, J., & Benson, G. (1986). How a corn plant develops. Iowa State University, Ames. Obtenido de <https://www.iastate.edu/>
- Ruiz, C. (1995). *Mezcla de Bacillus thuringiensis con insecticidas químicos para el control de Spodoptera frugiperda y Heliotis zea en maíz*. Tesis pre grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- San Blas, E., Pirela, D., García, D., & Potrillo, E. (2014). Ammonia concentration at emergence and its effects on the recovery of different species of entomopathogenic nematodes. *Experimental Parasitology* (144), 1-5.
- Sáenz A., A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*, 26(2), 41-57. Obtenido de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/download/1131/1131>
- Salcedo, G. (2012). *Acción patogénica de Heterorhabditis bacteriophora (Poinar) sobre el caracol manzana (Pomacea canaliculata Lamarck), plaga de los cultivos de arroz (Oriza sativa) en la cuenca baja del río Daule, Guayas, Ecuador*. Universidad de Guayaquil, Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces. Obtenido de <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2013/mayo/4.pdf>
- Sánchez, L. (2002). *Heterorhabditis bacteriophora (Poinar) Cepa CH1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles*. Tesis doctoral, Universidad Agraria de la Habana, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Torregrosa, F. (1997). *Esquema de mejoramiento de maíz en la Sierra Ecuatoriana*. INIAP, Quito.

- VKM. (2014). *Risk assessment of the biological plant protection products Nemasys G and Nemasys H with the active organism Heterorhabditis Bacteriophora*. Norwegian Scientific Committee for food safety. Obtenido de <https://vkm.no/download/18.a665c1015c865cc85bb77c2/1498483172752/963a74ef4d.pdf>
- Wang, J., & Bedding , A. (1996). Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *steinernema carpocapsae* in the larva *Galleria mellonella*. *Fundamental and Applied Nematology*(19), 363-367.
- Yáñez, G. (2007). *Manual de producción de maíz para pequeños agricultores*. FAO, INAMHI, MAG., Quito, Ecuador.
- Zenner de Polonia, I., Álvarez, A., & Barreto , S. (2006). Influence of parasitism by *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides. *Neotrop. Entomol.*, 35 (6), 818-822.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Acondicionamiento de macetas en invernadero en el área de Forestales (EEA Vista Florida - INIA)

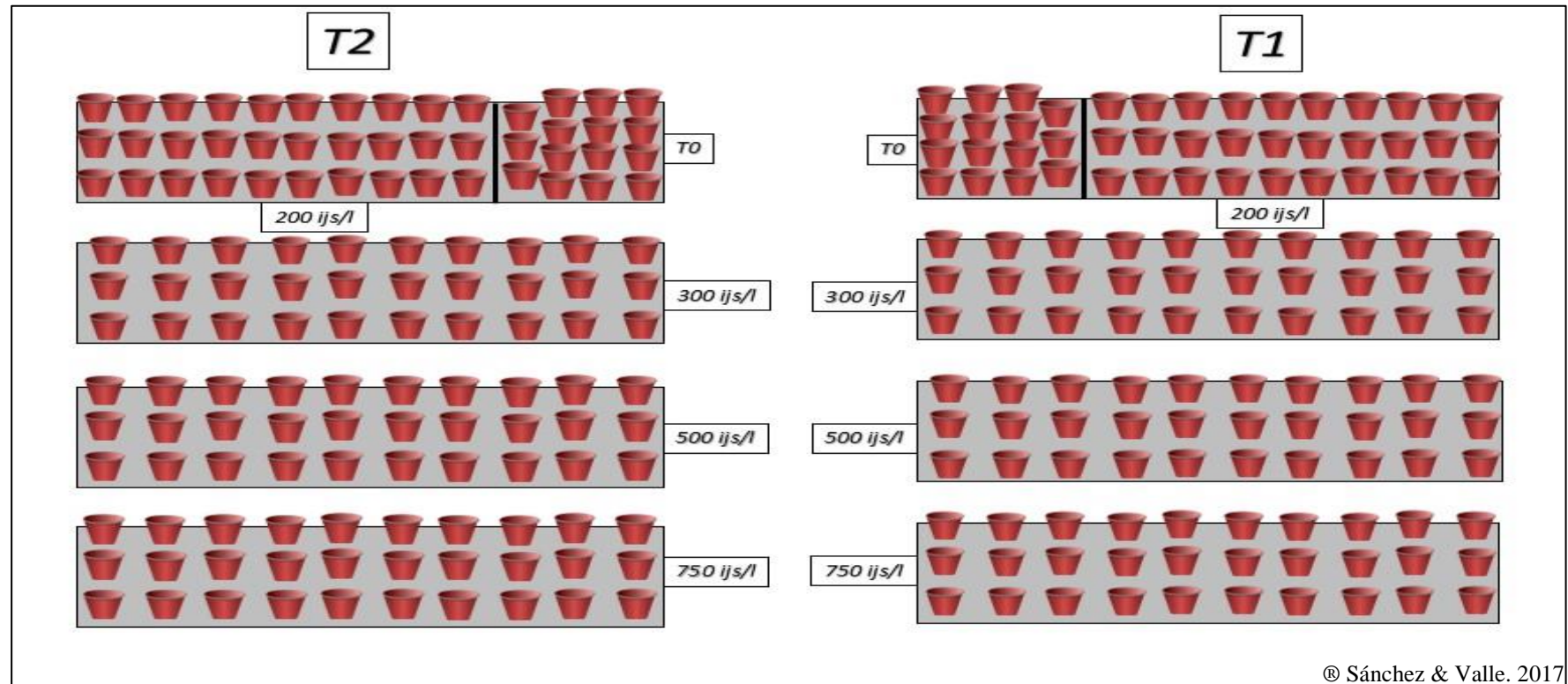


Fig. 30 Esquema general de la disposición de las macetas en el Invernadero del Área de Forestales del INIA (EEA – vista Florida)

*Donde:

T0: Grupo control (0 ijs/larva)

T1: *H. bacteriophora*

T2: *H. sp.*

200, 300, 500, 750 ijs/larva/planta: Concentraciones de infectivos juveniles (ijs)

*Total de macetas: 270

30 macetas: Grupo control

30 macetas: por concentración

ANEXO 2

Cronología de actividades durante los ensayos

ACTIVIDAD	INICIO	FIN	NOTAS
1ER ENSAYO	08/05/2017		Recolectar Tierra (20 sacos de 50 kilos) y esterilizar con formaldehído
A1 (Tierra)	16/05/2017		Colocar la tierra en los 270 macetas (ordenar en invernadero) y siembra de maíz
B1 (Fertilización)	25/05/2017		Fertilización
C1 (Parasit. NEPs) & (Posturas)	01/06/2017		Parasitación NEPs y Ac. Posturas de Cogollero
D1 (C.H NEPs)	06/06/2017		Cámara húmeda NEPs
E1 (L3 - Infestación plantas)	12/06/2017		Larvas L3 (Infestar plantas de maíz con Larvas de cogollero)
F1 (Aplicación NEPs)	12/06/2017		Conteo y Aplicación de NEPs en plantas infestadas con larvas de cogollero
G1 (Evaluación)	14/06/2017	15/06/2017	EVALUACIÓN

2DO ENSAYO	01/07/2017		Recolectar Tierra (20 sacos de 50 kilos) y esterilizar con formaldehído
A2 (Tierra)	03/07/2017	05/07/2017	Colocar la tierra en los 270 macetas (ordenar en invernadero) y siembra de maíz
B2 (Fertilización)	17/07/2017		Fertilización
C2 (Parasit. NEPs)	21/07/2017		Parasitación NEPs
C2 (Posturas)	24/07/2017		Ac. Posturas de Cogollero
D2 (NEPs)	28/07/2017		Cámara húmeda NEPs
E2 (L3 - Infestación plantas)	03/08/2017		Larvas L3 (Infestar plantas de maíz con Larvas de cogollero)
F2 (Aplicación NEPs)	03/08/2017		Conteo y Aplicación de nemátodos en plantas infestadas con larvas de cogollero
G2 (Evaluación)	04/08/2017	05/08/2017	EVALUACIÓN

Continuación...

3ER ENSAYO	07/08/2017		Recolectar Tierra (20 sacos de 50 kilos) y esterilizar con formaldehido
A3 (Tierra)	09/08/2017		Colocar la tierra en los 270 macetas (ordenar en invernadero) y siembra de maíz
B3 (posturas)	21/08/2017		Fertilización
C3 (Parasit. NEPs)	23/08/2017		Parasitación NEPs
C3 (Posturas)	24/08/2017	25/08/2017	Ac. Posturas de Cogollero
D3 (NEPs)	31/08/2017		Cámara húmeda NEPs
E3 (L3 - Infestación plantas)	06/09/2017		Larvas L3 (Infestar plantas de maíz con Larvas de cogollero)
F3 (Infestación NEPs)	06/09/2017		Conteo y Aplicación de nemátodos en plantas infestadas con larvas de cogollero
G3 (Evaluación)	07/09/2017	08/09/2017	EVALUACIÓN

ANEXO 3

Proceso de elaboración de solución de Agar nutriente al 0,1 % y medición de pH

Composición típica de Agar nutriente GranuCult™ ISO 6579, ISO 10273 e ISO 21528 (Merck)

Especificado por ISO 6579, ISO 6785 / IDF 93, ISO 10273, ISO 19250, ISO 21528, APHA		GranuCult™ Nutrient Agar	
Peptona	gl	Peptona	gl
Extracto de carne	gl	Extracto de carne	gl
Agar	gl	Agar agar*	gl
Agua	1000 ml / l	Agua	n/a
pH a 25 ° C	7.0 ± 0.2	pH a 25 ° C	7.0 ± 0.2

Proceso de elaboración de Agar nutriente al 0,1%

- ✓ Se esterilizo agua en 2 matraces de 1 L y uno de 500 ml (taponeados con algodón y papel aluminio), en una autoclave alrededor de 2 horas aproximadamente y se dejó enfriar mediante refrigeración durante 10 minutos (Fig. 31 - A).
- ✓ Una vez enfriado el agua, se procedió a pesar 2,5 gr de Agar nutriente (primero se pesó 1,5 gr y luego 1gr de Agar nutriente) (Fig. 31 - B).
- ✓ El agua en los matraces fue vertida en una olla de 3 L (debidamente esterilizada), con la finalidad de hervir junto con el agar.
- ✓ Obtenido la solución de Agar nutriente de 2,5 gr en 2,5 litros de agua (0,1 %); se dejó enfriar en refrigeración por 5 minutos (Fig. 31 - C).



Fig. 31 Preparación de la solución de Agar al 0,1%. Esterilización de agua en autoclave (A). Estimación de peso en gramos de Agar Nutriente (B). Obtención de solución de Agar Nutriente al 0,1% (C).

Medición del pH de la solución de Agar nutriente al 0,1%

Al Sumergir la cinta de pH en la solución de Agar Nutriente al 0,1 %, alrededor de 3 minutos, este registró un ph de 7 – 8 (Fig. 32)



Fig. 32 Resultado de pH de la solución de Agar Nutriente al 0,1%.

ANEXO 4

Análisis de varianza para el daño registrado en plantas de los ensayos con *H. bacteriophora* y *H. sp* a las 48 horas

Análisis de varianza para el daño registrado en plantas, a las 48 horas de los ensayos con *H. bacteriophora*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	84,916	3	28,305	3,087	,089
Intra-grupos	73,333	8	9,166		
Total	158,25	11			

Fuente: IBM SPSS

Análisis de varianza para el daño registrado en plantas, a las 48 horas de los ensayos con *H. sp.*

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	33,666	3	11,222	9,619	0,00496432
Intra-grupos	9,333	8	1,1666		
Total	43	11			

Fuente: IBM SPSS

ANEXO 5

Prueba de homogeneidad de varianzas y análisis de varianza para los tratamientos con *H. bacteriophora* a las 48 horas

Prueba de homogeneidad de varianzas

MORTALIDAD DE LARVAS DE COGOLLERO A LAS 48 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,491	3	8	,698

Fuente: IBM SPSS

Anova de un factor

MORTALIDAD DE LARVAS A LAS 48 HORAS

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	151,583	3	50,528	11,440	,003
Intra-grupos	35,333	8	4,417		
Total	186,917	11			

Fuente: IBM SPSS

ANEXO 6

Prueba de homogeneidad de varianzas y análisis de varianza para *H. sp* a las 48 horas

Prueba de homogeneidad de varianzas

MORTALIDAD DE LARVAS DE COGOLLERO A LAS 48 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,014	3	8	,094

Fuente: IBM SPSS

Anova de un factor

MORTALIDAD DE LARVAS A LAS 48 HORAS

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	67,333	3	22,444	24,485	,000
Intra-grupos	7,333	8	,917		
Total	74,667	11			

Fuente: IBM SPSS

ANEXO 7

Prueba *Post hoc* HSD Tukey para *H. bacteriophora* y *H. sp* a los 48 horas

Prueba HSD Tukey para *H. bacteriophora* a las 48 horas

CC	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
200	3	16,00		
300	3	19,33	19,33	
500	3		23,00	23,00
750	3			25,33
Sig.		,284	,221	,555
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.				

Fuente: Microsoft Excel, complemento Megastat

Prueba HSD Tukey para *H. sp* a las 48 horas

CC	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
200	3	14,00		
300	3	15,33	15,33	
500	3		17,00	
750	3			20,33
Sig.		,381	,222	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.				

Fuente: Microsoft Excel, complemento Megastat

ANEXO 8

Bloques aleatorizados y Análisis de varianza para ambos tratamientos y repeticiones del ensayo a las 48 horas

Bloques aleatorizados para ambos tratamientos y repeticiones del ensayo a las 48 horas

MORTALIDAD DE LARVAS A LAS 48 HORAS

Fuente	Media	Desviación estándar
200 Hb	16,000	2,646
300 Hb	19,333	2,082
500 Hb	23,000	2,000
750 Hb	25,333	1,528
200 sp	14,000	1,000
300 sp	15,333	0,577
500 sp	17,000	0,000
750 sp	20,333	1,528
1º repetición	20,000	4,629
2º repetición	18,750	3,732
3º repetición	17,625	3,777
Total	18,792	4,011

Fuente: Microsoft Excel, complemento Megastat

Análisis de varianza para ambos tratamientos y repeticiones del ensayo

MORTALIDAD DE LARVAS A LAS 48 HORAS

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	22,58	2	11,292	7,87	,0051
Repeticiones	327,29	7	46,756	32,59	0,0000001
Error	20,08	14	1,435		
Total	369,96	23			

Fuente: Microsoft Excel, complemento Megastat

ANEXO 9

Prueba de comparación simultanea de Tukey para ambos tratamientos a las 48 horas

Concentración/ tratamiento		200 sp	300 sp	200 Hb	500 sp	300 Hb	750 sp	500 Hb	750 Hb
	Media	14,000	15,333	16,000	17,000	19,333	20,333	23,000	25,333
200 sp	14,00								
300 sp	15,33	,1943							
200 Hb	16,00	,0601	,5065						
500 sp	17,00	,0084	,1104	,3239					
300 Hb	19,33	,0001	,0011	,0042	,0317				
750 sp	20,33	0,000	,0002	,0006	,0042	,3239			
500 Hb	23,00	0,000	0,000	0,000	0,000	,0022	,0164		
750 Hb	25,33	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	,0002	,0317	

Fuente: Microsoft Excel, complemento Megastat

ANEXO 10

Pruebas para determinar la CL50-48 de *H. bacteriophora*

Determinación de la CL50-48 en el mes de Junio 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	63,3333%	61,7434%	30	19,0000	18,5230	0,4770	0,0123
2,4771	70,0000%	72,2959%	30	21,0000	21,6888	-0,6888	0,0219
2,6990	83,3333%	83,1642%	30	25,0000	24,9493	0,0507	0,0001
2,8751	90,0000%	89,5002%	30	27,0000	26,8501	0,1499	0,0008

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	132,2591	LD50 Error Estándar	117,1766
<i>LD50 LCL</i>	9,4773	<i>LD50 UCL</i>	216,7214
<i>Log10[LD50]</i>	2,1214	<i>Error Estándar</i>	0,3467
<i>Beta</i>	1,6634	<i>Intercepto</i>	1,4713
<i>Beta Error Estándar</i>	0,6144		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	0,7226	1,4182	5,2795	69,0510	8,6437E-5	31,3475
5	3,3548	1,1323	1,1014	13,5627	85,1197	0,0026	54,5051
10	3,7183	1,3509	0,9329	22,4319	94,7853	0,0162	73,3272
16	4,0056	1,5236	0,7999	33,3881	102,6679	0,0679	92,8358
20	4,1585	1,6156	0,7293	41,2622	106,7747	0,1458	105,3414
25	4,3258	1,7161	0,6523	52,0130	110,9953	0,3357	121,0595
30	4,4760	1,8064	0,5834	64,0328	114,3254	0,7092	137,3093
40	4,7471	1,9694	0,4599	93,1892	118,2055	2,7241	173,0660
50	5,0000	2,1214	0,3467	132,2591	117,1766	9,4773	216,7214
60	5,2529	2,2735	0,2383	187,7093	108,2329	32,2734	277,2638
70	5,5240	2,4364	0,1404	273,1799	89,8670	110,4474	392,2477
75	5,6742	2,5267	0,1138	336,3097	89,1763	192,7396	538,5940
80	5,8415	2,6273	0,1304	423,9342	129,2218	290,9707	944,1933
84	5,9944	2,7193	0,1771	523,9129	219,6603	367,7398	1.819,3057
90	6,2817	2,8920	0,2931	779,8019	567,1922	502,5918	7.083,4196
95	6,6452	3,1105	0,4544	1.289,7494	1.609,3484	698,9133	42.222,1083
99	7,3268	3,5203	0,7666	3.313,2845	9.394,4175	1.240,7499	1.254.834,2839

Fuente: IBM SPSS

Determinación de la CL50-48 en el mes de Agosto 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	50,0000%	52,2406%	30	15,0000	15,6722	-0,6722	0,0288
2,4771	66,6667%	63,6369%	30	20,0000	19,0911	0,9089	0,0433
2,6990	76,6667%	76,3429%	30	23,0000	22,9029	0,0971	0,0004
2,8751	83,3333%	84,3741%	30	25,0000	25,3122	-0,3122	0,0039

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	185,0163	LD50 Error Estándar	94,5375
<i>LD50 LCL</i>	39,6977	<i>LD50 UCL</i>	272,0583
<i>Log10[LD50]</i>	2,2672	<i>Error Estándar</i>	0,2132
<i>Beta</i>	1,6615	<i>Intercepto</i>	1,2330
<i>Beta Error Estándar</i>	0,5768		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	0,8668	1,0977	7,3588	45,7774	0,0018	36,3593
5	3,3548	1,2770	0,8340	18,9244	63,1754	0,0345	64,2144
10	3,7183	1,4958	0,6938	31,3175	74,2047	0,1661	87,1507
16	4,0056	1,6687	0,5835	46,6344	83,2794	0,5737	111,1602
20	4,1585	1,7608	0,5250	57,6461	87,9365	1,1086	126,6755
25	4,3258	1,8614	0,4613	72,6845	92,5598	2,2754	146,3235
30	4,4760	1,9518	0,4045	89,5022	95,9426	4,3322	166,8312
40	4,7471	2,1150	0,3035	130,3105	98,6642	13,7527	212,8841
50	5,0000	2,2672	0,2132	185,0163	94,5375	39,6977	272,0583
60	5,2529	2,4194	0,1349	262,6883	82,8894	108,6013	366,8502
70	5,5240	2,5826	0,1022	382,4603	90,8292	253,2994	637,1365
75	5,6742	2,6730	0,1254	470,9538	137,8934	336,0757	1.042,4190
80	5,8415	2,7737	0,1722	593,8136	241,6493	418,9867	1.982,3204
84	5,9944	2,8657	0,2231	734,0301	393,9604	494,0256	3.702,2295
90	6,2817	3,0386	0,3268	1.093,0317	902,1951	649,5799	12.402,7397
95	6,6452	3,2574	0,4633	1.808,8347	2.317,0860	896,0433	58.680,0256
99	7,3268	3,6676	0,7244	4.651,7003	11.891,5130	1.601,0587	1.106.661,8385

Fuente: IBM SPSS

Determinación de la CL50-48 en el mes de Septiembre 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	46,6667%	46,0599%	30	14,0000	13,8180	0,1820	0,0024
2,4771	56,6667%	57,2917%	30	17,0000	17,1875	-0,1875	0,0020
2,6990	70,0000%	70,5403%	30	21,0000	21,1621	-0,1621	0,0012
2,8751	80,0000%	79,4671%	30	24,0000	23,8401	0,1599	0,0011

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	230,4853	LD50 Error Estándar	91,3209
<i>LD50 LCL</i>	71,6682	<i>LD50 UCL</i>	326,0945
<i>Log10[LD50]</i>	2,3626	<i>Error Estándar</i>	0,1679
<i>Beta</i>	1,6056	<i>Intercepto</i>	1,2066
<i>Beta Error Estándar</i>	0,5583		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	0,9135	1,0791	8,1935	48,8097	0,0023	39,2253
5	3,3548	1,3380	0,8052	21,7755	67,8132	0,0493	70,6727
10	3,7183	1,5644	0,6596	36,6736	79,7297	0,2517	96,9859
16	4,0056	1,7433	0,5452	55,3726	89,2537	0,9108	124,8623
20	4,1585	1,8386	0,4845	68,9549	93,9135	1,8036	143,0508
25	4,3258	1,9427	0,4186	87,6482	98,1972	3,8000	166,2937
30	4,4760	2,0363	0,3600	108,7134	100,8121	7,4010	190,8397
40	4,7471	2,2051	0,2568	160,3654	100,4433	24,3722	247,4622
50	5,0000	2,3626	0,1679	230,4853	91,3209	71,6682	326,0945
60	5,2529	2,5202	0,1065	331,2652	82,0131	186,1331	486,5342
70	5,5240	2,6890	0,1285	488,6562	146,6466	348,2783	1.110,3410
75	5,6742	2,7825	0,1724	606,0988	246,9017	427,0972	2.023,7573
80	5,8415	2,8867	0,2304	770,4092	428,2080	514,3085	4.116,1288
84	5,9944	2,9820	0,2872	959,3820	681,7497	599,5068	8.010,9053
90	6,2817	3,1609	0,3980	1.448,5478	1.521,1723	784,8773	28.502,7283
95	6,6452	3,3873	0,5414	2.439,5967	3.892,1451	1.087,5604	144.083,8575
99	7,3268	3,8118	0,8137	6.483,6213	20.611,4882	1.973,7994	3.054.612,5963

Fuente: IBM SPSS

ANEXO 11

Pruebas para determinar la CL50-48 de *H. sp*

Determinación de la CL50-48 en el mes de Junio 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	46,6667%	43,7918%	30	14,0000	13,1375	0,8625	0,0566
2,4771	50,0000%	51,8428%	30	15,0000	15,5528	-0,5528	0,0197
2,6990	56,6667%	61,8398%	30	17,0000	18,5520	-1,5520	0,1298
2,8751	73,3333%	69,2777%	30	22,0000	20,7833	1,2167	0,0712

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	273,4833	LD50 Error Estándar	386,1212
<i>LD50 LCL</i>	4,9454	<i>LD50 UCL</i>	439,7917
<i>Log10[LD50]</i>	2,4369	<i>Error Estándar</i>	0,4972
<i>Beta</i>	1,1497	<i>Intercepto</i>	2,1982
<i>Beta Error Estándar</i>	0,5382		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	0,4132	6,4237	2,5893	3.434.482,3244	0,0000	28,8712
5	3,3548	1,0060	4,6705	10,1389	237.411,4359	0,0000	59,3373
10	3,7183	1,3221	3,7363	20,9959	57.201,8963	0,0000	87,4184
16	4,0056	1,5720	2,9986	37,3269	18.604,6035	2,0965E-10	119,1560
20	4,1585	1,7051	2,6064	50,7066	10.242,5769	8,5449E-9	140,8324
25	4,3258	1,8505	2,1781	70,8839	5.341,0037	4,9108E-7	169,5899
30	4,4760	1,9812	1,7946	95,7579	2.982,9075	1,8577E-5	201,2921
40	4,7471	2,2169	1,1081	164,7932	1.050,3721	0,0128	281,3705
50	5,0000	2,4369	0,4972	273,4833	386,1212	4,9454	439,7917
60	5,2529	2,6569	0,3391	453,8603	391,4824	248,5404	5.304,2236
70	5,5240	2,8927	0,9566	781,0646	3.490,8006	474,3576	2.666.828,0739
75	5,6742	3,0233	1,3334	1.055,1494	11.343,0047	580,4236	97.858.181,1115
80	5,8415	3,1688	1,7581	1.475,0159	42.241,3962	710,1665	5.535.124.853,8916
84	5,9944	3,3018	2,1486	2.003,7324	141.054,8257	846,0342	223820817173,06
90	6,2817	3,5517	2,8845	3.562,2793	1.365.340,1691	1.162,2521	2,3589E+14
95	6,6452	3,8679	3,8178	7.376,8488	24.243.811,8681	1.720,1664	1,5892E+18
99	7,3268	4,4607	5,5701	28.885,3079	5.367.766.501,1374	3.547,8132	2,4262E+25

Fuente: IBM SPSS

Determinación de la CL50-48 en el mes de Agosto 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	50,0000%	49,4396%	30	15,0000	14,8319	0,1681	0,0019
2,4771	53,3333%	53,3990%	30	16,0000	16,0197	-0,0197	2,4202E-5
2,6990	56,6667%	58,3349%	30	17,0000	17,5005	-0,5005	0,0143
2,8751	63,3333%	62,1650%	30	19,0000	18,6495	0,3505	0,0066

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	211,8007	LD50 Error Estándar	169,2261
<i>LD50 LCL</i>	50,4592	<i>LD50 UCL</i>	889,0251
<i>Log10[LD50]</i>	2,3259	<i>Error Estándar</i>	0,3179
<i>Beta</i>	0,5642	<i>Intercepto</i>	3,6877
<i>Beta Error Estándar</i>	0,5302		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	-1,7982	4,1242	0,0159	105,9325	1,3133E-10	1.928.906,6766
5	3,3548	-0,5901	2,9909	0,2570	125,8214	3,5296E-7	187.088,2446
10	3,7183	0,0541	2,3872	1,1328	138,1481	2,3722E-5	54.092,2983
16	4,0056	0,5634	1,9109	3,6591	148,9938	0,0007	20.357,2069
20	4,1585	0,8345	1,6578	6,8312	155,2548	0,0038	12.127,2830
25	4,3258	1,1310	1,3817	13,5197	162,5249	0,0265	6.904,9772
30	4,4760	1,3972	1,1349	24,9554	169,3247	0,1488	4.184,2484
40	4,7471	1,8776	0,6955	75,4429	179,5235	3,2684	1.741,3846
50	5,0000	2,3259	0,3179	211,8007	169,2261	50,4592	889,0251
60	5,2529	2,7742	0,2706	594,6159	394,9846	175,3080	2.016,8394
70	5,5240	3,2547	0,6615	1.797,5854	3.926,0745	90,8322	35.574,5310
75	5,6742	3,5209	0,9027	3.318,0853	13.052,9941	56,4400	195.068,8465
80	5,8415	3,8174	1,1758	6.566,8849	48.997,2890	32,5710	1.324.000,2237
84	5,9944	4,0885	1,4274	12.259,7314	163.765,0892	19,5353	7.693.801,7180
90	6,2817	4,5977	1,9022	39.601,8477	1.580.705,8664	7,4018	211.881.767,0472
95	6,6452	5,2420	2,5050	174.568,9196	27.921.363,8583	2,1486	1,4183E+10
99	7,3268	6,4500	3,6376	2.818.487,9296	6.118.341.124,0874	0,2090	3,8002E+13

Fuente: IBM SPSS

Determinación de la CL50-48 en el mes de Septiembre 2017

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,3010	43,3333%	42,8344%	30	13,0000	12,8503	0,1497	0,0017
2,4771	50,0000%	49,8406%	30	15,0000	14,9522	0,0478	0,0002
2,6990	56,6667%	58,6477%	30	17,0000	17,5943	-0,5943	0,0201
2,8751	66,6667%	65,3611%	30	20,0000	19,6083	0,3917	0,0078

Fuente: IBM SPSS

Estadísticos de Regresión

LD50	302,7644	LD50 Error Estándar	90,3479
<i>LD50 LCL</i>	170,1060	<i>LD50 UCL</i>	538,8774
<i>Log10[LD50]</i>	2,4811	<i>Error Estándar</i>	0,1277
<i>Beta</i>	1,0029	<i>Intercepto</i>	2,5118
<i>Beta Error Estándar</i>	0,5341		

Fuente: IBM SPSS

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2,6732	0,1610	1,2957	1,4487	14,2737	0,0042	501,8215
5	3,3548	0,8406	0,9358	6,9280	29,4753	0,1015	472,8169
10	3,7183	1,2030	0,7446	15,9606	42,8843	0,5542	459,6752
16	4,0056	1,4895	0,5943	30,8697	56,7234	2,1117	451,2687
20	4,1585	1,6421	0,5149	43,8591	65,0661	4,2940	447,9757
25	4,3258	1,8088	0,4288	64,3943	74,4231	9,2986	445,9413
30	4,4760	1,9586	0,3526	90,9085	82,1962	18,5119	446,4344
40	4,7471	2,2289	0,2217	169,3933	90,2574	62,2950	460,6167
50	5,0000	2,4811	0,1277	302,7644	90,3479	170,1060	538,8774
60	5,2529	2,7333	0,1400	541,1445	177,4227	287,7405	1.017,7136
70	5,5240	3,0036	0,2513	1.008,3356	616,5214	324,4095	3.134,1276
75	5,6742	3,1534	0,3242	1.423,5148	1.164,1897	329,5367	6.149,2215
80	5,8415	3,3202	0,4085	2.090,0190	2.268,5199	330,8150	13.204,2958
84	5,9944	3,4727	0,4869	2.969,4567	4.071,8995	329,8553	26.731,9458
90	6,2817	3,7592	0,6362	5.743,2883	11.761,3571	325,2915	101.402,4758
95	6,6452	4,1216	0,8267	13.231,2752	43.405,4173	317,1156	552.059,4327
99	7,3268	4,8012	1,1862	63.273,5883	483.656,9522	299,4245	13.370.804,2473

Fuente: IBM SPSS