

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**BIOPROSPECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS  
NATIVOS DE LAS REGIONES CAÑERAS COMO ALTERNATIVA DE  
CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE *Phyllophaga* spp. EN CAÑA  
DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.), DIECA, GRECIA**

Proyecto presentado como requisito parcial para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**VALERY JIMÉNEZ BENAVIDES**

**SAN CARLOS, 2022**



**DERECHOS RESERVADOS © 2022 VALERY JIMÉNEZ BENAVIDES**

**BIOPROSPECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS DE LAS REGIONES CAÑERAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE *Phyllophaga* spp. EN CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.), DIECA, GRECIA**

**VALERY JIMÉNEZ BENAVIDES**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

Ing. Agr. Joaquín Durán Mora, Ph D.

---

Asesor principal

Ing. Agr. Alejandro Rodríguez Morales, M. Sc.

---

Asesor externo

Ing. Agr. Jose Daniel Salazar Blanco, Lic.

---

Jurado

Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, Ph D.

---

Jurado

Ing. Agr. Carlos Ramírez Vargas, Ph D.

---

Coordinador (a)  
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Milton Villarreal Castro, Ph. D.

---

Director  
Escuela de Agronomía

**2022**

## **DEDICATORIA**

A mi abuelo Federico Jiménez, quien hoy no está físicamente a mi lado pero siempre soñó con verme convertida en Ingeniera Agrónoma, siempre fue mi apoyo y mi guía, quien junto a mi papá cultivó en mí el amor por el campo.

A mis papás Alvaro Jiménez y Ada Luz Chavarría, quienes siempre han dado lo mejor por mí, me han apoyado y han sido mi sostén a lo largo de mi vida, quienes me han inculcado valores y han dado las herramientas para alcanzar mis propósitos.

A mis hermanos Natalyn, Marcia, José, Justin y Rachel quienes han caminado a mi lado, han sido un ejemplo y un gran apoyo, este logro también es de ustedes.

A mi abuela Juana Benavides, por estar a mi lado siempre y demostrarme tanto cariño a lo largo de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y terminar una de las etapas que siempre anhelé.

Al equipo de trabajo de DIECA por acompañarme en este proceso y brindarme las herramientas necesarias para culminar con éxito el proyecto.

A mi padrino y cuñado Marco Morales, quien ha sido un apoyo incondicional en el desarrollo de esta etapa.

A mis compañeros y amigos: Jose Pablo Mora, Erika Campos, Óscar Solera, José Jiménez, Allison Venegas, Esteban Garro, Luis Azofeifa, Luis Arce, Alejandra Soto, Vinicio Barquero, Josué Calderón y Gloriana Monge quienes me apoyaron e hicieron de esta etapa universitaria una de las mejores experiencias.

A cada uno de los profesores que con vocación fueron parte de mi formación profesional.

## **CONTRIBUYENTES Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Este proyecto de investigación fue propuesto por el Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) el cual pertenece a la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA) por lo que todos los gastos fueron cubiertos por este ente, el cual se ubica en Santa Gertrudis Sur de Grecia.

Al Ing. Alejandro Rodríguez, gerente de DIECA el cual apoyó la idea del proyecto y estuvo anuente a colaborar para el desarrollo de este, además de los Ingenieros Agrónomos José Daniel Salazar Blanco y Eduardo Cadet Piedra, el Técnico Rodrigo Oviedo y la Biotecnóloga Argerie Oviedo del Programa de Fitosanidad y Manejo de Plagas quienes brindaron conocimiento, apoyo desde la facilitación de transporte y materiales, el ingreso a las diversas fincas y el desarrollo de cada una de las etapas de la investigación. Aunado a ellos los encargados del Laboratorio de Investigación y Control de Calidad Biotecnólogo Marco Porras y David Murillo quienes fueron participes y de gran ayuda para el proyecto.

## NOMENCLATURA

SIGLA	Definición
DIECA	Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar
ha	Hectárea
LAICA	Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar
NEPs	Nematodos entomopatógenos
MIP	Manejo Integrado de Plagas

## INDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTRIBUYENTES Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO .....	IV
NOMENCLATURA .....	V
INDICE DE CONTENIDOS .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN .....	XI
ABSTRACT .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivo general.....	4
1.4 Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis .....	4
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Origen y distribución de la caña de azúcar .....	5
2.2 Botánica de la caña de azúcar .....	5
2.2.1 Raíces.....	5
2.2.2 Tallo .....	6
2.2.3 Hoja .....	7
2.2.4 Flor .....	7
2.2.5 Ciclo de desarrollo del cultivo.....	7
2.3 Requerimientos edáficos y climáticos.....	9
2.4 Situación de la caña de azúcar en Costa Rica.....	10
2.4.1 Zonas productoras.....	11
2.4.2 Región Atlántica (Turrialba).....	11

2.4.3 Región Sur.....	11
2.4.4 Región Norte.....	12
2.4.5 Región Valle Central .....	12
2.4.6 Región Puntarenas.....	12
2.4.7 Región Guanacaste.....	12
<b>2.5 Plagas de importancia económica.....</b>	<b>12</b>
2.5.1 <i>Phyllophaga</i> spp. (Joboto).....	13
2.5.1.1 Ciclo de vida.....	13
2.5.1.1.1 Huevo .....	14
2.5.1.1.2 Larva.....	14
2.5.1.1.3 Pupa.....	15
2.5.1.1.4 Adulto.....	15
2.5.1.2 Descripción de daños al cultivo .....	15
<b>2.6 Manejo de <i>Phyllophaga</i> spp. ....</b>	<b>16</b>
2.6.1.1 Control Cultural.....	17
2.6.1.2 Control Físico .....	17
2.6.1.3 Control Químico.....	17
2.6.1.4 Control Biológico.....	18
2.6.2 Nematodos entomopatógenos.....	18
2.6.2.1 Ciclo biológico.....	19
2.6.2.2 Factores ambientales que afectan .....	21
2.6.2.2.1 Humedad .....	21
2.6.2.2.2 Radiación ultravioleta .....	21
2.6.2.2.3 Temperatura .....	22
2.6.2.2.4 Textura del suelo.....	22
2.6.2.3 Métodos de reproducción .....	22
2.6.2.3.1 Reproducción <i>in vivo</i> .....	22
2.6.2.3.2 Reproducción <i>in vitro</i> .....	23
2.6.2.4 Aplicación de NEPs.....	23
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Ubicación.....	24
3.2 Periodo de estudio .....	25
3.3 Muestreo de suelos.....	25
3.4 Características del hábitat: análisis fisicoquímicos y microbiológico .....	26
3.5 Material experimental y Universo de estudio.....	27
3.6 Área experimental y unidad experimental .....	28
3.7 Aislamiento y cría de nematodos.....	28
3.7.1 Identificación de nematodos entomopatógenos .....	30
3.8 Evaluación de patogenicidad de los nematodos entomopatógenos en laboratorio .....	31
3.8.1 Obtención de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.....	31



3.8.2	Aplicación de aislados de nematodos entomopatógenos .....	31
3.9	Efectividad biológica de los nematodos entomopatógenos en invernadero .....	32
3.10	Repeticiones .....	33
3.11	Descripción de tratamientos .....	33
3.12	Variables de respuesta.....	36
3.13	Análisis estadístico.....	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
4.1	Presencia y ausencia de nematodos a partir de muestras de suelo de dos hábitats en diversas regiones cañeras.....	37
4.1.1	Caracterización del hábitat .....	39
4.1.2	Aislados a partir de las muestras de suelo .....	42
4.3	Potencial de aislados de nematodos entomopatógenos en diferentes dosis en invernadero.....	48
5.	CONCLUSIONES.....	54
6.	RECOMENDACIONES .....	55
7.	BIBLIOGRAFIA.....	56
8.	ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Página
<b>Cuadro 1.</b>	Requerimientos edafoclimáticos y el nivel de aptitud al cultivo de caña de azúcar.	10
<b>Cuadro 2.</b>	Tratamientos aplicados en larvas L3 de <i>Phyllophaga</i> spp. a nivel de laboratorio, DIECA.	34
<b>Cuadro 3.</b>	Cantidad de muestras con presencia y ausencia de nematodos entomopatógenos según el hábitat y la región cañera.	39
<b>Cuadro 4.</b>	Promedio ( $\pm$ DE) de las variables medidas en las muestras de suelo por región y hábitat.	40
<b>Cuadro 5.</b>	Medias ( $\pm$ EE) de las variables medidas en las muestras de suelo por hábitat.	42
<b>Cuadro 6.</b>	Medias ( $\pm$ EE) del porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. según el tratamiento aplicado en laboratorio.	46
<b>Cuadro 7.</b>	Medias ( $\pm$ EE) del porcentaje de daño causado a través del tiempo en larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. según el tratamiento aplicado.	47
<b>Cuadro 8.</b>	Media ( $\pm$ EE) del porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. según el tratamiento aplicado en invernadero.	50
<b>Cuadro 9.</b>	Medias ( $\pm$ EE) del porcentaje de daño causado a través del tiempo en larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. según el tratamiento aplicado en invernadero.	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Titulo	Página
<b>Figura 1.</b>	Tipos de raíces en planta joven de caña de azúcar.....	6
<b>Figura 2.</b>	Etapas fenológicas del cultivo de caña de azúcar. ....	8
<b>Figura 3.</b>	Ciclo de vida de los jobotos ( <i>Phyllophaga</i> spp.).....	14
<b>Figura 4.</b>	Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos. ....	21
<b>Figura 5.</b>	Distribución de fincas cañeras muestreadas por región.....	24
<b>Figura 6.</b>	Hábitats en los que se realizaron los muestreos. A) Plantación de caña de azúcar; B). Zonas aledañas a la plantación.....	26
<b>Figura 7.</b>	Método de aislamiento de nematodos entomopatógenos con la técnica larva cebo. .....	29
<b>Figura 8.</b>	Trampa White utilizada para el aislamiento de nematodos entomopatógenos.....	30
<b>Figura 9.</b>	Infección de larvas de <i>G. mellonella</i> con nematodos de los géneros. A) Heterhorabditis; B) Steinernema.....	43

## RESUMEN

En Costa Rica la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se considera una de las actividades de mayor relevancia del sector agropecuario por los beneficios que genera a nivel económico y social. Es por ello, que conforme pasan los años se buscan soluciones para el control de diversas plagas que afectan al cultivo y que no permiten su adecuado desarrollo y por ende impactan su producción. Una de las plagas de mayor importancia económica en el sector cañero a nivel nacional es *Phyllophaga* spp. conocida como joboto que genera daños a nivel de sistema radicular de las plantas, lo cual facilita el ingreso de enfermedades. Se han tenido diversos controles como el químico, el cual tiene un precio elevado y ha generado resistencia en la plaga; teniendo presente que en la actualidad se busca disminuir el uso de productos químicos por su nivel de toxicidad y difícil degradación, se deben buscar alternativas de control biológico.

Este estudio pretende ampliar el conocimiento y aplicabilidad del control biológico utilizando nematodos entomopatógenos, debido a la preocupación de controlar el joboto ya que otros métodos resultan ineficientes. De acuerdo con lo anterior, el objetivo general fue realizar una bioprospección de nematodos entomopatógenos en diferentes regiones cañeras del país para la búsqueda de agentes de control de *Phyllophaga* spp.

En la primer etapa se realizaron muestreos de suelo en cuatro regiones cañeras de Costa Rica: Guanacaste, Sur (Pérez Zeledón), Puntarenas y Valle Central, para obtener aislados de nematodos entomopatógenos mediante la técnica de larva cebo con *Galleria mellonella* a partir de estas muestras y caracterizar el hábitat donde se encontraron. En la etapa dos se evaluó la mortalidad (%) causada por los aislados obtenidos en larvas de *Phyllophaga* spp. en el Laboratorio de Investigación y Control de Calidad DIECA, mientras en la última etapa en invernadero se probó los tres aislados con mayor efectividad de la etapa anterior a tres dosis distintas en potes con larvas de joboto y plántulas de caña para determinar la mortalidad y los tiempos en que se dieron estas.

Se encontraron 10 aislados a partir de las 24 muestras de suelo. De estos seis provenían de Pérez Zeledón, dos de Puntarenas, uno de Guanacaste y otro del Valle

Central. Se determinó que de estos seis se encontraron en hábitat cultivado y cuatro en alledaño. Respecto a las características que influyeron en la presencia o ausencia de nematodos se determinó estadísticamente que el pH, tasa de respiración y porcentaje de limo no tuvo relación, mientras altos porcentaje de arena y bajos de arcilla se relacionaron con la presencia de nematodos. Además los aislados se identificaron por sintomatología a nivel de géneros: 10 % de *Heterorhabditis* y 90 % de *Steinernema*.

Respecto a las mortalidades en laboratorio, los que obtuvieron diferencias significativas con los valores más altos fueron tres de los obtenidos en la Región Sur: 1A-PZ, 3A-PZ, 2C-PZ con valores desde 32 % hasta 40 %, siendo el cuarto día posterior a la infección el de mayor mortalidad. A nivel de invernadero los porcentajes de mortalidad no presentaron diferencias significativas respecto a los tratamientos, siendo el valor más alto de 32 %. Con relación al tiempo al cuarto día ocurrió el mayor porcentaje de mortalidad. Se concluye que se obtuvieron aislados de todas las regiones cañeras, siendo la Región Sur (Pérez Zeledón) donde se encontró mayor presencia de nematodos entomopatógenos. Dichos aislados presentaron una mortalidad total del 17 % en laboratorio y un 19 % en invernadero en larvas de *Phyllophaga* spp, lo cual motiva el continuar evaluando su efectividad como parte del MIP.

**Palabras clave:** Control biológico, plaga rizófaga, bacterias simbiotes, *Heterorhabditis*, *Steinernema*.

## ABSTRACT

In Costa Rica, sugarcane (*Saccharum* spp.) is considered one of the most relevant activities in the agricultural sector due to the benefits it generates at an economic and social level. That is why, as the years go by, solutions are sought to control various pests that affect the crop and that do not allow its proper development and therefore impact its production. One of the most economically important pests in the sugarcane sector at the national level is *Phyllophaga* spp., known as joboto, which causes damage to the root system of plants, which allows the entry of diseases. There have been various controls such as the chemical, which has a high price and has generated resistance in the plague; bearing in mind that currently the aim is to reduce the use of chemical products due to their level of toxicity and difficult degradation, biological control alternatives must be sought.

This study aims to expand the knowledge and applicability of biological control using entomopathogenic nematodes, due to the concern of controlling the joboto and those other methods are inefficient. In accordance with the above, the general objective was to carry out a bioprospection of entomopathogenic nematodes in different sugarcane regions of the country for the search for control agents of *Phyllophaga* spp.

In the first stage, soil sampling was carried out in four sugarcane regions of Costa Rica: Guanacaste, Sur (Pérez Zeledón), Puntarenas and Valle Central, to obtain isolates of entomopathogenic nematodes through the bait larva technique with *Galleria mellonella* from these samples and characterize the habitat where they were found, in stage two, the mortality (%) caused by the isolates obtained in larvae of *Phyllophaga* spp. in the DIECA Research and Quality Control Laboratory, while in the last stage in the greenhouse, the three most effective isolates from the previous stage were tested at three different doses in pots with joboto larvae and cane seedlings to determine mortality and the times in which these occurred.

10 isolates were found from the 24 soil samples, of these six came from Pérez Zeledón, two from Puntarenas, one from Guanacaste and another from the Valle Central, it was determined that of these six were found in cultivated habitat and four in the surrounding area, regarding the characteristics that influenced the presence or

absence of nematodes, it was statistically determined that the pH, respiration rate and percentage of slime had no relation, while high percentages of sand and low percentages of clay were related to the presence of nematodes; in addition, the isolates were identified by symptomatology at the genus level: 10% of *Heterorhabditis* and 90% of *Steinernema*.

Regarding laboratory mortalities, those that obtained significant differences with the highest values were three of those obtained in the South Region: 1A-PZ, 3A-PZ, 2C-PZ with values from 32 % to 40 %, being the fourth day after the infection the one with the highest mortality. At the greenhouse level, the mortality percentages did not present significant differences with respect to the treatments, the highest value being 32 %, in relation to time on the fourth day, the highest percentage of mortality occurred. It is concluded that isolates were obtained from all the sugarcane regions, being the South-Pérez Zeledón Region where the greatest presence of entomopathogenic nematodes was found. These isolates presented a total mortality of 17 % in the laboratory and 19 % in the greenhouse in larvae of *Phyllophaga* spp.

**Key words:** Biologic control, rhizophagus pest, symbiotic bacteria, *Heterorhabditis*, *Steinernema*.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Costa Rica la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se considera una de las actividades de mayor relevancia del sector agropecuario por los beneficios que genera a nivel económico y social, ya que tiene participación tanto en el Producto Interno Bruto, como en la producción de divisas y la generación de empleos directos e indirectos (Chaves 2006, Chaves y Bermúdez 2015). Es por ello, que conforme pasan los años se buscan soluciones para el control de diversas plagas que afectan al cultivo y que no permiten su adecuado desarrollo y por ende impactan su producción (Flores 2017).

Una de las plagas de mayor importancia económica en el sector cañero a nivel nacional es *Phyllophaga* spp. la cual se conoce como joboto. El joboto genera daños a nivel de sistema radicular de las plantas, lo cual facilita el ingreso de enfermedades, ya que hongos y bacterias utilizan las heridas realizadas por las larvas al alimentarse de las raíces (Salazar 2010, Salazar et al. 2016). De acuerdo con lo anterior, para el combate de esta plaga se han tenido diversos controles como el químico, el cual tiene un precio elevado y ha generado resistencia en la plaga, ya que el mercado nacional no cuenta con diversidad de productos por lo que se vuelven menos eficientes (Carlos et al. 1999, Loera-Gallardo et al. 2015).

Teniendo presente que en la actualidad se busca disminuir el uso de productos químicos por su nivel de toxicidad y difícil degradación, se deben buscar alternativas de control biológico. En el caso de los jobotos, una alternativa biológica son los nematodos entomopatógenos (NEPs), los cuales son caracterizados por su asociación con bacterias simbiotas que logran eliminar de manera rápida al insecto parasitado y a su vez procuran la sostenibilidad de la actividad agrícola (Elsa Liliana et al. 2012, Acuña-Segura y Brenes-Madriz 2020).

### 1.1 Antecedentes

El joboto (*Phyllophaga* spp.) ha sido una de las plagas de mayor importancia económica en la caña de azúcar ya que esta afecta la raíz del cultivo directamente, por lo cual es necesario considerar medidas de manejo y control. Se han realizado muestreos a 30 cm de profundidad para determinar el impacto y se ha considerado que



entre 8 y 10 larvas/m<sup>2</sup> provocan una gran afectación al sistema radicular de la planta (Salazar 2010). Cabe destacar que entre las regiones cañeras más afectadas por joboto se encuentra el Valle Central, Zona Sur, Puntarenas y Guanacaste (MAG 2015, LAICA 2021).

Se considera que el manejo de *Phyllophaga* spp. es complejo debido a su hábito de vida, ubicación en el suelo y factores físicos, además de condiciones ambientales que provocan una alta tasa de reproducción en periodos en que es difícil realizar control por el desarrollo del cultivo o las condiciones del terreno (Acuña-Segura y Brenes-Madriz 2020). En Costa Rica, LAICA (Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar) es el encargado de buscar alternativas con el fin de controlar dicha plaga en el sector cañero. Por ello cuentan con el Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) y el programa de manejo de plagas. En dicho programa se han implementado diversos controles culturales, uso de trampas y feromonas, además de productos químicos, pero estos no han tenido el éxito esperado (Calvo et al. 2016, LAICA 2016).

Debido a lo anterior, DIECA se ha orientado a realizar investigación para buscar alternativas de controlar la plaga de manera biológica, pero manteniendo el Manejo Integrado de Plagas (MIP), esto con el fin de no afectar el ecosistema. Es por ello que se han utilizado diferentes microorganismos como lo son *Bacillus popilliae*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, pero estos no han logrado buenos resultados debido al hábito de esta plaga y las metodologías que han utilizado para su aplicación (Salazar et al. 2016, LAICA 2020,). Sin embargo, se siguen realizando investigaciones en esa línea ya que se conoce el potencial que estos tienen para el control de los jobotos en otros cultivos y condiciones (Salazar et al. 2016).

Como parte de las alternativas biológicas están los insecticidas microbiales conocidos como NEPs (nematodos entomopatógenos), a los cuales se les investiga la eficacia biológica principalmente de los géneros *Heterhorabditis* y *Steinernema* los cuales se asocian a *Photorhabdus* spp. y *Xenorhabdus* spp. respectivamente, esta asociación simbiótica con dichas bacterias provocan septicemia y otras afectaciones que causan la muerte del huésped (LAICA 2016, Vidaurre et al. 2020). De estos, se ha

determinado que *Heterhorabditis* ha tenido un porcentaje de control de *Phyllophaga* spp. del 80 % en invernaderos, pese a ello cabe destacar que estos nematodos entomopatógenos tienen mayor eficiencia en condiciones del suelo lo que los convierte en una gran estrategia de manejo a nivel de campo ya que la plaga se encuentra en el subsuelo (Ángulo 2015, Salazar et al. 2015).

Los nematodos representan una alternativa de control biológico de plagas del suelo, tal ha sido su impacto que se han realizado diversas investigaciones a nivel de laboratorio para determinar su nivel de mortalidad. Según mencionan Ruiz-Vega et al. (2020), en condiciones de laboratorio los nematodos del género *Steinernema* pueden causar mortalidades del 40 al 80 % sobre larvas de la especie *Phyllophaga vetula*, mientras en las mismas condiciones pero en el caso de *Phyllophaga bicolor* la mayor mortalidad fue del 48 % (Melo-Molina et al. 2007). Pese a lo anterior, ambas investigaciones aseguran que se puede obtener una menor mortalidad en larvas más maduras (que se acercan a la prepupa), por lo que el manejo se debe realizar en los primeros instares larvales para que haya mayor infección y por ende más mortalidad (Melo-Molina et al. 2007, Ruiz-Vega et al. 2020).

## **1.2 Justificación**

La necesidad de buscar alternativas de manejo de *Phyllophaga* spp. en el cultivo de caña de azúcar, es medular para considerar el control biológico con nematodos entomopatógenos, por ello se desea conocer el efecto que tendrían los NEPs nativos de las regiones cañeras en larvas L3 de joboto a nivel de laboratorio para seleccionar los aislados más virulentos y realizar el control de estas a nivel de invernadero.

### **1.3 Objetivo general**

Realizar una bioprospección de nematodos entomopatógenos en diferentes regiones cañeras del país para la búsqueda de agentes de control de *Phyllophaga* spp.

### **1.4 Objetivos específicos**

1. Realizar aislamiento de nematodos entomopatógenos a partir de muestras de suelo de diversas regiones cañeras y la respectiva caracterización del hábitat para determinar la presencia o ausencia de estos.
2. Establecer el potencial patogénico *in vitro* de los nematodos entomopatógenos con *Phyllophaga* spp.
3. Evaluar bajo condiciones controladas (invernadero) la efectividad biológica de los nematodos entomopatógenos seleccionados.

### **1.5 Hipótesis**

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) nativos de las regiones cañeras del país son una alternativa de control biológico de las larvas de la plaga *Phyllophaga* spp. (joboto) en el cultivo de caña de azúcar.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Origen y distribución de la caña de azúcar**

El cultivo de caña de azúcar es originario de las regiones subtropicales y tropicales del sudeste de Asia que abarca India, China, Nueva Guinea y zonas aledañas, este fue de gran relevancia en la dieta de las primeras civilizaciones 3000 a.C., cabe destacar que India fue el primer país en explotarlo comercialmente para producir azúcar (Ruiz 1995). Posterior a ello, Alejandro Magno se encarga de trasladar la caña de azúcar de India a Persia y los árabes se encargaron de llevarla a Siria, Palestina, Arabia y Egipto, de esa manera se expande el cultivo a todo el continente europeo y africano (Ruiz 1995, Díaz y Portocarrero 2002).

Posteriormente en 1493 en el segundo viaje de Cristóbal Colón a América introduce la caña en dos países: República Dominicana y Haití, estos se encargan de la distribución a Cuba, Puerto Rico, México, Colombia, Perú y otros países (Díaz y Portocarrero 2002). En el caso de Costa Rica, se presume que fue Pedrarias Dávila quien en 1530 introdujo por primera vez la caña de azúcar (Ruiz 1995).

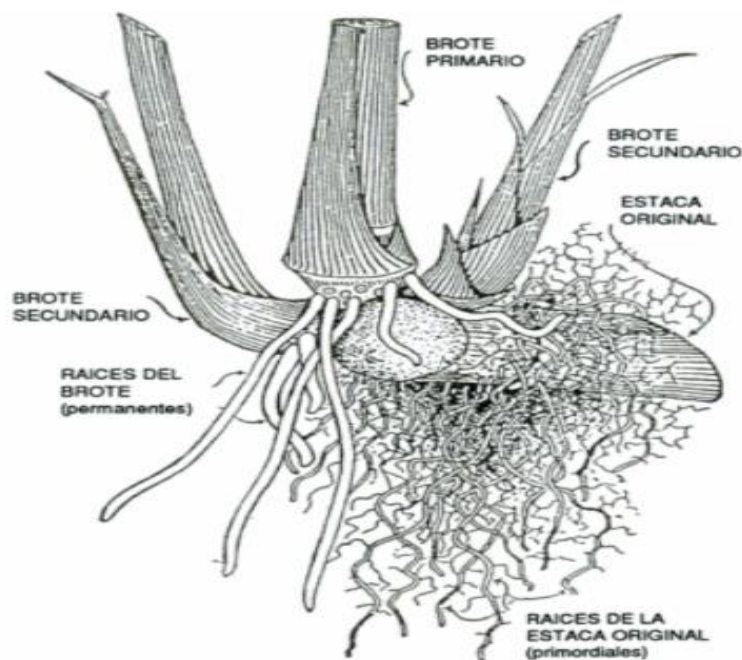
### **2.2 Botánica de la caña de azúcar**

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se considera una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las poáceas (Díaz y Portocarrero 2002). En el tallo de esta planta se forma y acumula jugo rico en sacarosa del cual mediante la cristalización se forma el azúcar, esta sacarosa se sintetiza debido a la energía tomada durante la fotosíntesis, por ello al igual que otras plantas está se constituye por raíces, tallos, hojas y flores (Ruiz 1995, Osorio 2007).

#### **2.2.1 Raíces**

Su principal función es absorber los nutrientes, agua y las sales minerales, además de dar el anclaje a la planta, estas pueden alcanzar profundidades de 80 cm del suelo (Fogliata 1995). En el caso de la raíz primaria se encuentra en el embrión, las que se originan en la zona cercana al entrenudo del tallo se les conoce como adventicias (Ruiz 1995, Osorio 2007).

En el caso de las adventicias pueden ser de dos tipos conocidas como primordiales y permanentes, las primeras se caracterizan por formarse a partir de los primordios radicales, son delgadas y ramificadas, además son pasajeras puesto que se encargan de absorber agua y sales minerales para el desarrollo de la yema y una vez que esta germine e inicie el macollamiento son sustituidas por las permanentes (Figura 1) (Osorio 2007, Lopez 2015). Estas últimas brotan en el momento que se desarrollan nuevos tallos por efecto del macollamiento, poseen un mayor diámetro, longitud y cantidad la cual aumenta con el desarrollo de la planta (Figura 1)(Osorio 2007, CONADESUCA 2015).



**Figura 1.** Tipos de raíces en planta joven de caña de azúcar.

Fuente: Osorio 2007.

### 2.2.2 Tallo

Desde el punto de vista productivo es el órgano de mayor importancia puesto que almacena los azúcares en las células de parénquima que posee; este se forma producto de la germinación de las yemas y se encuentra segmentado en nudos y entrenudos, la longitud de estos últimos varía según la variedad y el desarrollo de la planta (Wagih et al. 2004, Sandhu et al. 2016). Respecto al hábito de crecimiento lo ideal es que sea en forma erecta para facilitar la cosecha, sin embargo presenta arreglos variados como

lo son erectos pero inclinados con ángulo abierto, curvados, postrados y en estados intermedios (Lopez 2015).

### **2.2.3 Hoja**

Se forma a partir de los nudos de manera alterna a lo largo del tallo, están formadas por lámina foliar, yagua y vaina (Osorio 2007). En el caso de la lámina foliar es la de mayor importancia en la fotosíntesis, a lo largo de su forma posee una nervadura central y protuberancias aserradas en el borde (Ruiz 1995, Sandhu et al. 2016).

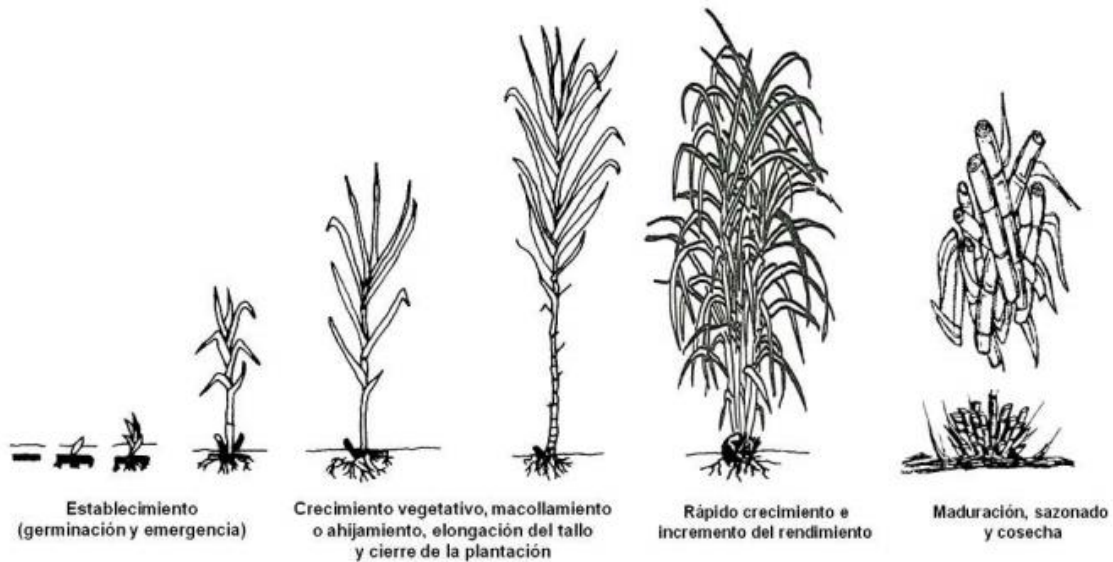
La hoja es un órgano especializado que se encuentra en forma de vaina, tiene como función principal realizar la fotosíntesis y proteger la yema, cabe destacar que conforme la caña se desarrolla las hojas bajas caen y son sustituidas por las que crecen en los nudos superiores (Díaz y Portocarrero 2002, Sandhu et al. 2016).

### **2.2.4 Flor**

Debido a una serie de condiciones a nivel fisiológico como la edad y nutrición y ambientales como lo son la temperatura, humedad y fotoperíodo se dan ciertos cambios del patrón de crecimiento vegetativo, lo que causa que se paralice la formación de nuevo tejido vegetativo y que se desarrolle la inflorescencia (Fogliata 1995, Ruiz 1995, Sandhu et al. 2016). Este órgano reproductivo es una panícula abierta con forma y tamaño variable, las flores se caracterizan por ser hermafroditas completas (Lopez 2015, Sandhu et al. 2016).

### **2.2.5 Ciclo de desarrollo del cultivo**

El ciclo de desarrollo vegetativo en la caña de azúcar tiene una duración variable ya que depende de la variedad, de factores climáticos y el tiempo de plantación (Ruiz 1995, Cock 2003). En el caso de plantaciones de primera cosecha (caña planta) tarda de 10 a 17 meses y pasa por cuatro fases las cuales son germinación, amacollamiento, rápido crecimiento y maduración (Figura 2), mientras las de segundo corte (caña soca) puede tardar de nueve a 13 meses y consta de tres etapas: brotación y amacollamiento, rápido crecimiento y maduración (Ruiz 1995, Díaz y Portocarrero 2002, CONADESUCA 2015).



**Figura 2.** Etapas fenológicas del cultivo de caña de azúcar.

Fuente: CONADESUCA, 2015.

### **2.2.5.1 Germinación y emergencia**

En esta etapa los órganos primordios latentes en la yema se activan al estado de crecimiento y desarrollo, puede dar inicio de siete a 10 días posterior a la siembra y se extiende hasta los 35 días, por lo que es esencial que cuente con temperaturas entre los 24 y 37° C, siempre y cuando haya humedad en el suelo. Además, para que sea una fase exitosa debe tenerse en cuenta la magnitud, el ritmo y la uniformidad del crecimiento inicial que tenga la plántula (Ruiz 1995, Cock 2003, CONADESUCA 2015).

### **2.2.5.2 Amacollamiento**

Se da a partir de los 35 a 40 días después de la siembra, en esta etapa se da el mayor desarrollo de follaje y brote de tallos que se desarrollan en las articulaciones nodales de los tallos primarios, por lo cual es una fase en la que se define el rendimiento debido a que se establece el número de órganos que se podrán cosechar (Cock 2003). De acuerdo con lo anterior, son fundamentales los días de alta intensidad luminosa y temperaturas que rondan los 30° C, además de óptimas condiciones de humedad en el suelo ya que también se da el desarrollo de las raíces adventicias y las permanentes (Fogliata 1995, Cock 2003, Lopez 2015).

### **2.2.5.3 Rápido crecimiento**

Se da desde los 120 hasta los 180 días después de la siembra, en esta ocurre la formación y extensión del cultivo de manera más rápida, además se acumula materia seca y aumenta el área foliar (Cock 2003, Aguilar-Rivera 2011, Sandhu et al. 2016). Cabe destacar que en esta etapa queda definida la población de tallos de la plantación ya que de todos los retoños formados solo sobrevive entre el 40-50 %, estos necesitan temperaturas mayores a los 30° C, gran cantidad de nutrientes y una adecuada humedad para el buen desarrollo radical y por ende de absorción de nutrientes para una correcta acumulación de sacarosa (Ruiz 1995, Lopez 2015).

### **2.2.5.4 Maduración**

Esta fase tiene una duración de dos a tres meses ya que se ocurre la síntesis y almacenamiento de sacarosa en los tallos, esta maduración es efectuada en el ápice de la planta, específicamente en la base de este (Cock 2003). Para que ocurra la acumulación de sacarosa se deben cumplir diversas condiciones para inhibir el crecimiento de la planta como lo son: las noches frescas con temperaturas que rondan los 18° C, días calurosos y secos; por otra parte es fundamental elegir la variedad correcta para obtener la modalidad y la producción de azúcar por hectárea que se desea (Fogliata 1995, Ruiz 1995, Lopez 2015).

## **2.3 Requerimientos edáficos y climáticos**

Dentro de los factores que inciden tanto directa como indirectamente en el desarrollo de la caña de azúcar se encuentran los climáticos y edáficos (Cuadro 1) pese a que este cultivo se encuentra en diversos climas y en más de 100 países no todas las zonas cuentan con los requerimientos favorables por lo que en cada una de estas deben realizarse diversas prácticas de manejo que se adecuen al lugar para obtener los niveles de producción rentables (Fogliata 1995, Ruiz 1995, Wagih et al. 2004, Aguilar-Rivera 2011).



**Cuadro 1.** Requerimientos edafoclimáticos y el nivel de aptitud al cultivo de caña de azúcar.

Propiedad	Nivel de aptitud al cultivo de caña de azúcar			
	Alta	Media	Baja	No Apta
Temperatura anual (°C)	22-32	20/22-32/35	18-20	<18
Precipitación media anual (mm)	>1,500	1,250-1,500	1,250-1,000	<1,000
Radiación solar (horas/año)	1800-2200	1800-1400	1400-1200	<1200
Índice de severidad de sequía	Leve	Moderada	Fuerte a Muy Fuerte	Severa
Pendiente (%)	0-8	8-16	16-30	>30
Altitud (msnm)	Hasta 400	400-850	850-1,300	>1300
Balance Hídrico (mm mes <sup>-1</sup> )	> 0 (Húmedo)	0 -50 (Sub húmedo)		< -50
Número de meses húmedos por año (Meses año <sup>-1</sup> )	>8	>6 <8	>5 <6	<5 (Seco)
Drenaje externo	bueno moderado	imperfecto-moderado	pobre	pobre-inundable
Drenaje interno	bien drenado	Mod. bien drenado	Imp. drenado algo ex. drenado	muy pobre drenado
Profundidad (cm)	>100	80-100	50-80	<50
Textura	Franco-Arcilloso	Arcilloso	Franco-Arenoso	Arenoso
pH	6.6 – 7.3	6.1 – 6.5 7.4 -8.3	5.6 -6.0 > 8.3	< 5.5
CIC (meq/100g)	> 20	15 - 20	15-10	< 10
Materia orgánica (%)	> 5	3-5	2-3	1-2
N (%)	>0.4	0.1 - 0.4	0.032 – 0.1	< 0.032
Nitrógeno disponible) kg ha <sup>-1</sup>	> 300	300-225	225-150	<150
P (ppm)	>40	39-18	17-9	<9
K ppm	>468	468-82	78-42.9	<39
Ca (ppm)	>2004	1002-2004	400-1002	<400
Mg (ppm)	>365	158-365	60-158	<60
Azufre SO <sub>4</sub> (ppm)	>20	20-15	15-10	<10
Boro (ppm)	1.5 – 2.0	1.0 – 1.5	0.5 – 1.0	< 0.5
Cu (ppm)	1.2-2.5	0.8-1.20	0.3-0.8	<0.3
Fe (ppm)	16.0-25.0	10.0-16.0	5.0-10.0	<5.0
Mn (ppm)	29.0-50.0	14.0-29.0	5.0-14.0	<5.0
Zn (ppm)	5.0-8.0	3.0-5.0	1.0-3.0	<1.0
Na (ppm)	<345	345-575	575-920	>920
Cloruros (meq/L)	<10	15-23	26-36	>36
Salinidad (mmhos/cm)	< 8	8 - 12	12 - 16	> 16
Relación Ca/Mg	>15	2.5-15	1.5-2.5	<1.5
Relación Ca/K	>25	25-15	15-5	<5
Relación C/N	8 -12	12-15	15-30	>30
Rendimiento esperado (t/ha)	>80	80-60	60-40	<40

Fuente: Aguilar-Rivera 2011.

## 2.4 Situación de la caña de azúcar en Costa Rica

La caña de azúcar al igual que las diversas actividades productivas en Costa Rica representa un relevante y determinante factor de bienestar social y desarrollo económico (Chaves 2016). Respecto al bienestar social se producen cerca de 25000 empleos directos y más de 100000 indirectos aportando de esa manera en un 9,3 % del empleo agropecuario y un 1,3 % del nacional (Flores 2017). Además, el sector

genera y factura entre US\$200 y US\$250 millones al año por la venta de productos como melaza, azúcar y de valor agregado (Chaves y Bermúdez 2012).

Cabe destacar que los valores macroeconómicos no reflejan la relevancia que tiene el sector cañero en el país, ya que pese a su reducción a nivel de exportaciones es un cultivo de gran interés en muchas regiones. Lo anterior, debido a que la caña de azúcar sigue representando el sustento social y económico de muchas personas y familias costarricenses (Barrantes 2017). Además, se puede mencionar que la caña de azúcar es uno de los pocos productos agrícolas que tiene suficientes rendimientos para realizar exportaciones sin afectar el mercado local, lo cual es de gran beneficio para el país ya que aumenta el ingreso de divisas y a la vez da una soberanía alimentaria por posibles eventos ambientales que causen desabastecimientos de países exportadores a nivel mundial o bien por bloqueos comerciales (Chaves 2016, Barrantes 2017).

#### **2.4.1 Zonas productoras**

Costa Rica cuenta con aproximadamente 7078 productores de caña de azúcar los cuales tienen a cargo cerca de 64 249 hectáreas, estas se encuentran distribuidas en seis regiones las cuales poseen diversas condiciones a las que el cultivo debe adaptarse (MAG 2015, LAICA 2021)

#### **2.4.2 Región Atlántica (Turrialba)**

Cuenta con 4908 ha del cultivo ubicadas en la provincia de Cartago, la cual se caracteriza por estar a una altitud entre los 480-1500 msnm con suelos de los órdenes ultisol, andisol e Inceptisol. Además, cuenta con una precipitación anual de 2500- 3000 mm y una temperatura media de 18-23° C (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

#### **2.4.3 Región Sur**

En la Región Sur cultivan cerca de 4512 ha, las cuales se encuentran en una altitud de 350-750 msnm con temperaturas medias de 22-27° C, además la precipitación media anual es de 2400-4300 mm, en esta se encuentran suelos de los órdenes ultisol e inceptisol principalmente (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

#### **2.4.4 Región Norte**

Abarcan 9806 ha ubicadas en dos cantones Los Chiles y San Carlos, estos presentan suelos con tres órdenes predominantes como lo son el inceptisol, ultisol y andisol a una altitud de 40-680 msnm. En cuanto a las variables del clima, presenta una precipitación media anual de 1700-4300 mm y una temperatura media de 23-27° C (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

#### **2.4.5 Región Valle Central**

En esta Región se cultivan cerca de 4201 ha a una altitud de 600-1400 msnm, en suelos de distinto orden como lo son inceptisol, andisol, altisol y ultisol. En cuanto a la precipitación anual ronda entre los 1450-3900 mm, con una temperatura media de 20-27° C (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

#### **2.4.6 Región Puntarenas**

Se cultivan 5626 ha en suelos de orden entisol, inceptisol y alfisol. Esta zona se ubica a una altitud entre los 0-350 msnm, con una temperatura media de 25-29° C y precipitaciones de 1100- 2900 mm durante el año (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

#### **2.4.7 Región Guanacaste**

Es la de mayor producción con 35197 ha cultivadas con una altitud entre 5-160 msnm en suelos de los órdenes inceptisol, vertisol, molisol y entisol. Respecto a las condiciones climáticas presentan una precipitación media anual de 1100- 2600 mm y una temperatura media de 26-28° C (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

### **2.5 Plagas de importancia económica**

La fitosanidad del cultivo de caña de azúcar es dependiente de diversas condiciones y de la interacción que estas tengan, por lo que el manejo de la plantación es uno de los aspectos de mayor relevancia ya que junto a este, algunos factores como el clima y las características edáficas pueden provocar que ciertos organismos llamados plagas logren establecerse, proliferar y causar daños a las plantas lo que conlleva a pérdidas agroindustriales y económicas (Salazar 2010, Salazar et al. 2016). Entre las plagas que han estado presentes a lo largo de los años en las plantaciones cañeras nacionales

mostrando gran incidencia, mayor impacto económico, prioridad y combate se encuentran *Diatraea* spp. conocido como barrenador común del tallo, *Aeneolamia* spp., los jobotos (*Phyllophaga* spp.), el picudo (*Metamasius hemipterus*), y los taladradores mayor y menor del tallo: *Telchin atymnius*, *Elasmopalpus lignosellus* respectivamente (Salazar 2011, MAG 2015, Salazar et al. 2017).

De las anteriores, se han logrado controlar parcialmente mediante el uso del Manejo Integrado de Plagas (MIP), sin embargo las que afectan a nivel de raíz como es el caso de *Phyllophaga* spp. siguen siendo el principal problema por su complejo hábito de crecimiento a nivel del subsuelo (Salazar et al. 2017, 2018).

### **2.5.1 *Phyllophaga* spp. (Joboto)**

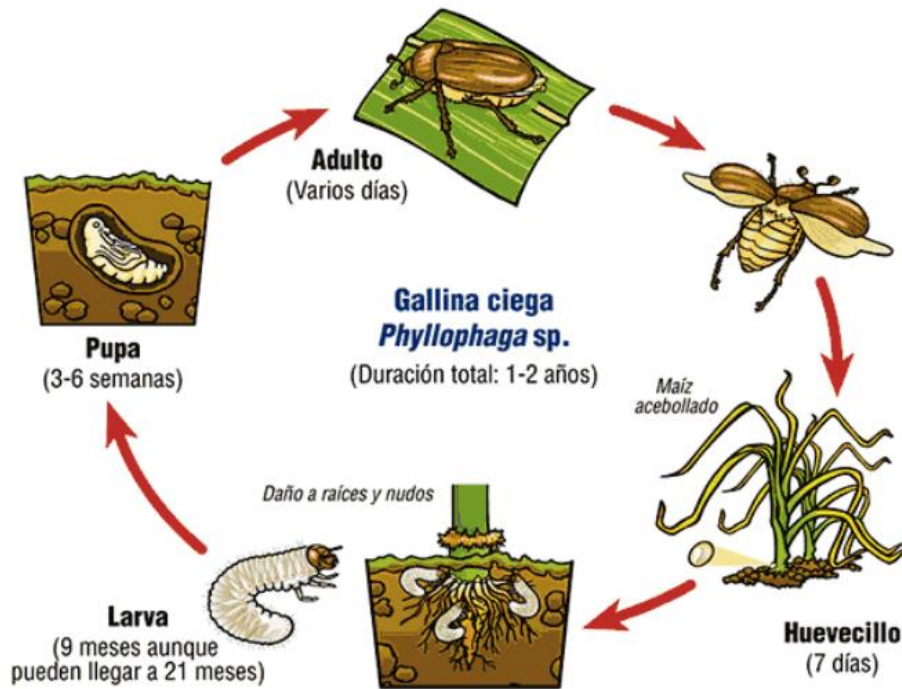
*Phyllophaga* spp. es un insecto de la familia *Scarabaeidae* que pertenece al orden Coleóptero y se conoce comúnmente como joboto. Éste organismo genera grandes afectaciones al sistema radicular por lo que se considera una plaga de importancia económica en el país (Salazar et al. 2015). Cabe destacar que en las plantaciones cañeras atacadas por esta plaga se observan pérdidas en el rendimiento hasta de 31 toneladas por hectárea; en cuanto al rendimiento de azúcar se reduce en 0,62 toneladas por cada larva encontrada en un metro cuadrado (Salazar et al. 2015, Calvo et al. 2016).

Se debe considerar que en la agricultura costarricense se tienen presente ocho especies de *Phyllophaga* en las que se encuentran *P. menetriesi* con mayor presencia en el Valle Central y *P. elenans* en el Pacífico, aunque también *P. valeriana* se ha presentado significativamente en el Valle Central y Turrialba (Moron y Solis 1994, Salazar et al. 2016).

#### **2.5.1.1 Ciclo de vida**

*Phyllophaga* spp. cuenta con una metamorfosis completa lo que indica que se desarrolla en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3) (Badilla 1995, Cueva 2014). Pese a que el adulto se alimenta del follaje de diversos cultivos, su estado larval es el que más problema presenta debido a sus hábitos rizófagos principalmente en el

tercer instar, se debe considerar que la mayoría de las especies logran concluir el ciclo en el suelo incluso hasta por dos años (Acuña-Segura y Brenes-Madriz 2020).



**Figura 3.** Ciclo de vida de los jobotos (*Phyllophaga* spp.).

**Fuente:** Cueva 2014

#### 2.5.1.1.1 Huevo

Se caracterizan por poseer formas variables que van desde esferoide, elipsoide hasta ligeramente cilíndrico, en el caso del color puede variar de un blanco translúcido a un blanco cremoso (Cueva 2014). Al paso de los días cuando se desarrolla mejor, el huevo se torna esférico y aumenta al doble su tamaño en comparación al momento en que fue ovipositado, cabe destacar que la hembra puede colocar hasta 100 huevos en un rango de tiempo de 15 a 22 días, según la especie. Esos se entierran en el suelo cerca de la cepa de la caña a profundidades que rondan los 10 cm, pasados los 10-12 días estos eclosionan y pasan al siguiente estado (Cueva 2014, Salazar et al. 2018).

#### 2.5.1.1.2 Larva

En esta fase se dan diversos cambios a lo largo de nueve o más meses ya que es el de mayor impacto en el cultivo, el primero ocurre cuando emerge y se rompe la cubierta

del huevo (corión) y posee una cápsula cefálica con partes bucales masticadoras, seguidamente se da un cambio de manera significativa en cuanto a las medidas de dicha cápsula (Shannon y Carballo 1996, Cueva 2014). Estas larvas se caracterizan por ser blancas-crema arrugadas, con el cuerpo en forma de “C”, presentan patas bien desarrolladas; en cuanto a su cabeza es grande, hipognata y muy esclerotizada con una coloración amarillo-café o rojo-café, además de poseer mandíbulas poderosas expuestas (Salazar 2010, Cueva 2014).

Las larvas logran fortalecer el aparato bucal al consumir tierra y restos orgánicos, es por ello que consiguen alimentarse de la raíz, de esta manera las larvas de segundo y tercer instar son las que causan mayor daño radical (Shannon y Carballo 1996). Al terminar su desarrollo larval se tornan amarillo, cesan su alimentación y se profundizan en el suelo donde forman una celda con el fin de hibernar o estivar antes de convertirse en pupa (Moron y Solis 1994, Salazar et al. 2018).

#### **2.5.1.1.3 Pupa**

Esta etapa tiene una duración de un mes en promedio, se da una similitud morfológica al adulto a excepción de que sus patas, alas y antena están contraídas al cuerpo. Para que este pase a la siguiente etapa debe romperse la exuvia pupal (Shannon y Carballo 1996, Cueva 2014).

#### **2.5.1.1.4 Adulto**

El adulto tiene una cutícula blanda, este se encuentra en la celda pupal hasta endurecer la quitina de la cutícula; posterior a ello se da la expansión de las alas a su tamaño particular y la maduración los órganos sexuales. El adulto se mantiene en su celda hasta alcanzar la madurez fisiológica y esta puede ser estimulada a la emergencia con la humedad del suelo (King 1984, Shannon y Carballo 1996, Salazar 2011).

#### **2.5.1.2 Descripción de daños al cultivo**

Al ser una plaga del sistema radical, en el estado larval se alimenta de este por lo que afecta las funciones normales de las raíces como lo es la reducción de la absorción de agua y nutrientes, por lo que provoca pérdidas de tonelaje y rendimiento de azúcar por hectárea, además de tornarse el follaje amarillento en las cercanías de la vena

central, síntoma que se observa primero en las hojas más jóvenes (Cueva 2014). Por otra parte se disminuye el anclaje de la cepa lo que causa su desprendimiento y se acorta la longevidad de la plantación (Shannon y Carballo 1996, Salazar 2011, Loera-Gallardo et al. 2015).

En cuanto a los daños físicos producidos en las raíces favorecen la entrada de hongos y bacterias que aceleran el deterioro y la pudrición de estas, además en el momento que la plaga se alimenta de las raíces enfermas y se desplaza a otras raíces sanas distribuye los patógenos. Se debe destacar que los daños generados tienen un patrón de ataque de tipo localizado ya que los jobotos tienden a unirse en el suelo (Loera-Gallardo et al. 2015, Salazar et al. 2018).

En Costa Rica los jobotos presentan mayor daño significativo en la Región del Valle Central, Guanacaste y Sur debido a que cuentan con plantaciones viejas, presencia de hospederos alternos aledaños al cultivo de la caña de azúcar, suelos con compactación, deficiencia al momento de preparar los terrenos ya sea para siembras por primera vez o para renovación, además la falta de interés de utilizar la técnica de trampeo para capturar los adultos (MAG 2015, Salazar et al. 2018).

## **2.6 Manejo de *Phyllophaga* spp.**

Las larvas de *Phyllophaga* al tener un comportamiento rizófago se ven favorecidas por la protección que les brinda el manto edáfico, por lo que genera una complejidad en el control de esta plaga (Salazar et al. 2015). De acuerdo con esa limitante y la extensa duración del ciclo ha sido indispensable desarrollar diversas estrategias de manejo integrado (Badilla 1995, Carlos et al. 1999, Salazar et al. 2016).

A lo largo de los años se intentó manejar la plaga con insecticidas sin embargo no fue viable por diversas razones como lo son la altura de la planta y el cierre de la plantación, el período prolongado en que son colocados los huevos, la difícil localización oportuna de las áreas afectadas ya que el daño se observa en el período vegetativo avanzado, además de la movilidad mínima de los productos químicos en los suelos pesados (Shannon y Carballo 1996, Loera-Gallardo et al. 2015, Salazar et al. 2018).

### **2.6.1.1 Control Cultural**

Como parte del control de *Phyllophaga* spp. es de importancia afectar los estadios de esta plaga encontrados en el suelo en las diversas épocas del año, con prácticas como la renovación de la plantación y una adecuada labranza de los suelos en caso de que ya el cultivo esté establecido para exponer el organismo a condiciones ambientales y depredadores (Carlos et al. 1999, Salazar et al. 2015). Para implementar estas estrategias se debe conocer la estructura del suelo, fenología del cultivo, época del año adecuada y la disponibilidad del equipo como rastra sanitaria, arados y subsolador (Salazar et al. 2016, 2017).

### **2.6.1.2 Control Físico**

En este control se utilizan las trampas de luz que pueden ser fluorescentes, negras, Kerosén y artesanales, las adhesivas de colores, y las trampas con feromonas sexuales como L-isoleucine methyl ester con el fin de capturar los adultos de joboto, estas deben ser colocadas en lugares visibles, cercanas a las plantas hospederas y que coincidan con el inicio de las lluvias (Altamirano 2007, Salazar et al. 2018). Esta técnica para capturar la plaga es la más recomendada, utilizada y de mayor eficiencia para evitar daños severos por las larvas, ya que se les corta el ciclo de vida al evitar la cópula entre adultos y por ende la oviposición por parte de las hembras en el suelo (Salazar et al. 2016, 2018).

### **2.6.1.3 Control Químico**

El uso del control químico para joboto es poco eficiente ya que requiere del contacto con la larva y esta se encuentra en el suelo a profundidades desde los 25 hasta los 60 cm, por lo que los productos químicos al suelo siguen siendo inconsistentes (Loera-Gallardo et al. 2015, Salazar et al. 2016). Además, se han utilizado insecticidas que se colocan en árboles trampa durante la copulación y alimentación de los adultos y como método alternativo, sin embargo tampoco muestran resultados efectivos (Salazar et al. 2017).

Por otra parte, en la etapa de siembra se acostumbra a aplicar insecticidas en la semilla sin embargo, se necesita realizar una programación de acuerdo con la aparición



de la plaga y la residualidad que presente el producto (LAICA 2016). Pese a ello, el problema de dicha práctica es que durante la siembra o renovación las raíces presentes no son las verdaderas por lo que el aprovechamiento del producto no es eficiente (Salazar et al. 2017, 2018).

#### **2.6.1.4 Control Biológico**

El uso de microorganismos patógenos principalmente los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana*, la bacteria *B. popillae* y los nematodos entomopatógenos tienen un gran potencial para el control de larvas de *Phyllophaga* spp. por lo que en la actualidad se fomenta el uso de estos (Salazar et al. 2015, 2016). Sin embargo, se siguen realizando investigaciones que busquen especies aún más eficientes y con mejores metodologías de aplicación, ya que en la actualidad esta es la principal limitación (LAICA 2020).

Cabe destacar que uno de los microorganismos que ha tomado auge por su eficiencia son los NEPs de los que se tienen dos principales géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* los cuales están asociados con bacterias que causan la muerte de las larvas (Melo-Molina et al. 2007, Salazar et al. 2015). De los anteriores se puede ver como un control completamente benéfico puesto que no solo controlan, sino que se adaptan al medio sin provocar daños en el medio, ni resistencia en la plaga (Salazar et al. 2018).

#### **2.6.2 Nematodos entomopatógenos**

Los nematodos por lo general son organismos vermiformes cuyo cuerpo tiene forma cilíndrica y una dimensión entre 0,25 mm y 5 mm, estos pueden clasificarse como de vida libre respecto a su alimentación ya que pueden alimentarse de hongos, bacterias y protozoarios, e incluso ser depredadores o parásitos al consumir plantas o incluso animales; en este último se encuentran los nematodos entomopatógenos que se encargan de parasitar a insectos que se desarrollen en el suelo o al menos una de las etapas del ciclo (Miret y Avilla 2005, Reyes 2009, White y Torres 2009, Atwa 2014). Lo anterior se debe a que el estado infectivo de los NEPs migra para encontrar una presa nueva a nivel de suelo y de esta manera seguir con el ciclo ( White y Torres 2009, Rojas 2018).

Los nematodos entomopatógenos corresponden al filo Nematoda y orden Rhabditida, estos tienen dos géneros de importancia como lo son *Steinernema* y *Heterorhabditis* que a su vez están asociados con las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* las cuales causan una septicemia y otras afectaciones al hospedero (Miret y Avilla 2005, White y Torres 2009, Rodríguez et al. 2012). De acuerdo con lo anterior, estos microorganismos son controladores biológicos potenciales ya que tienen alta virulencia y rapidez para matar el hospedero, gran potencial de reproducción, se pueden criar en laboratorio y cuentan con un amplio rango de acción, además el tercer estado es llamado juvenil infectivo y en este no se alimenta ya que está morfofisiológicamente adaptado para sobrevivir por períodos extensos en el suelo en ausencia de su hospedero (Divya y Sankar 2009, Jaramillo y Sáenz 2013, Ruiz-Vega et al. 2020).

Los NEPs no son perjudiciales para las plantas ya que son específicos para insectos, sin embargo, como aspectos negativos se encuentra la limitada tolerancia a las condiciones ambientales principalmente por sus requerimientos de humedad, además cuentan con tiempos de almacenamiento cortos y poca persistencia a nivel de campo (Divya y Sankar 2009, Rumbos y Athanassiou 2017, Rojas 2018). Pese a lo anterior, estos pueden ser manipulados para mejorar su patogenicidad y permanencia (Rumbos y Athanassiou 2017).

#### **2.6.2.1 Ciclo biológico**

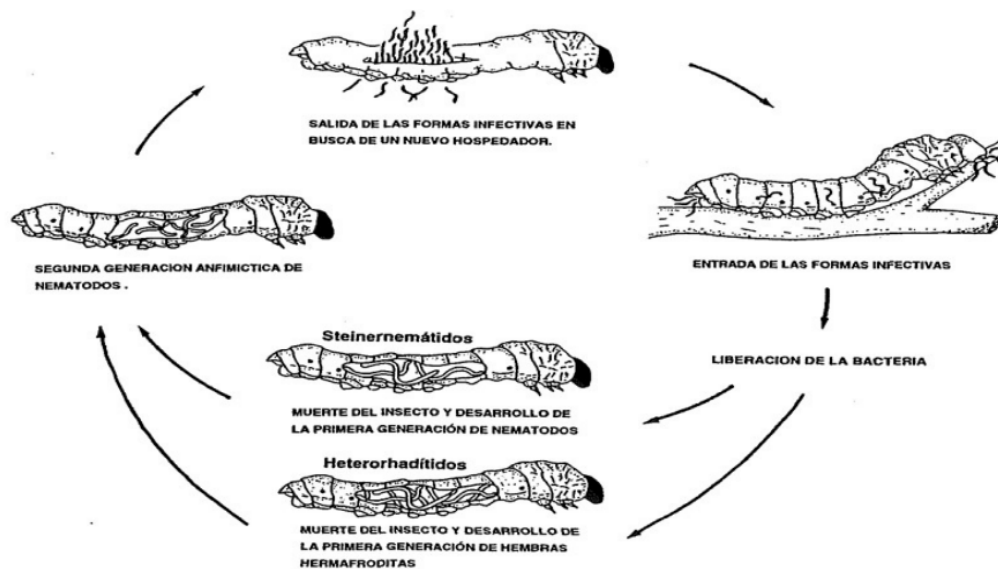
Para el desarrollo de los nematodos entomopatógenos estos deben pasar por el estado de huevo y por cuatro estados juveniles (Miret y Avilla 2005, Ángulo 2015). El ciclo es desarrollado en el interior del insecto a excepción del estadio tres el cual se conoce como infectivo, ya que en esa etapa sale del insecto ya muerto producto de la escasez de alimento y a través del suelo se desplaza a un nuevo hospedero (Figura 4), al cual ingresa por las aberturas que posee: ano, boca o espiráculos; en el caso de *Heterorhabditis* logra penetrar por la cutícula con un diente que posee en su parte anterior (Melo-Molina et al. 2007, Aponte y Olivares 2008, Ángulo 2015).

En el momento en que el juvenil infectivo (JI) está en el suelo no se alimenta ya que se dedica a desplazarse ya que tiene la capacidad de sobrevivir hasta encontrar un

nuevo hospedero e infectarlo (Aponte y Olivares 2008, Divya y Sankar 2009). Cabe destacar que a estos juveniles se les facilita la búsqueda del hospedero ya que pueden percibir diversos estímulos que este realiza como lo son la temperatura, heces y dióxido de carbono (Hazir et al. 2004, Aponte y Olivares 2008).

Los juveniles de *Heterorhabditis* y *Steinernema* al tener una simbiosis con las bacterias *Photorhabdus sp* y *Xenorhabdus sp* respectivamente, crea un beneficio para ambas partes debido a que la bacteria es la encargada de producir sustancias tóxicas para matar al insecto, enzimas para descomponer tejidos y a la vez brindar a los nematodos nutrientes para el adecuado desarrollo de su ciclo de vida (Hazir et al. 2004, White y Torres 2009, Alvarado 2012). Mientras tanto el nematodo se encarga de transportar la bacteria en su tubo digestivo para protegerla del medio exterior y para expulsarla dentro del insecto para facilitar la entrada al hemocele de este con el fin de liberar las células de la bacteria y reproducirse (Divya y Sankar 2009, White y Torres 2009).

En el momento en que la bacteria se reproduce se liberan exotoxinas y endotoxinas que provocan la muerte del insecto en uno o dos días, en el caso de las larvas parasitadas con la bacteria que transporta *Heterorhabditis* se tornan rojizas y las de *Steinernema* mantienen una coloración blancuzca (White y Torres 2009, Alvarado 2012). Posterior a ello, el ciclo continúa a juvenil cuatro y continúan alimentándose por lo que pueden desarrollarse hasta tres generaciones dentro del insecto (Ferrer et al. 2004, Ángulo 2015).



**Figura 4.** Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.

**Fuente:** Ángulo 2015.

## 2.6.2.2 Factores ambientales que afectan

### 2.6.2.2.1 Humedad

El porcentaje de humedad óptimo para la movilidad del nematodo varía según la textura del suelo, sin embargo en los arenosos ronda el 10 %, en los arenosos-arcillosos de 18-21 % y en el caso de los francos arenosos se requiere de un 25-30 % (Hazir et al. 2004, Rojas 2018). Lo anterior debido a que los nematodos necesitan de humedad en el suelo para el desplazamiento en busca del hospedero, ya que con bajos niveles de humedad se causa una desecación que provoca la muerte del nematodo y en humedades excesivas se genera una disminución del oxígeno en el suelo y por ende una afectación directa a este microorganismo (McClure et al. 2011, Alvarado 2012, Rojas 2018).

### 2.6.2.2.2 Radiación ultravioleta

La luz ultravioleta en exposición directa a los nematodos provoca la muerte de estos en un período corto, por ello si se dan aplicaciones cuando esta radiación es alta se puede causar la muerte hasta del 50 % de los microorganismos (Hazir et al. 2004, Divya y Sankar 2009). Por lo anterior, es recomendable aplicarlos durante las horas de la

mañana o tarde debido a que cuando los juveniles infectivos son expuestos a radiación durante tres minutos o más llegan a perder su capacidad de infección (Ferrer et al. 2004, Rojas 2018).

#### **2.6.2.2.3 Temperatura**

Esta variable es de gran relevancia para los nematodos, puesto que diversas especies se hacen más lentas en temperaturas inferiores a los 10° C y se pueden inactivar cuando alcanzan los 40° C (Reyes 2009, Alvarado 2012). De acuerdo con lo anterior, la temperatura puede aumentar la longevidad de estos siempre y cuando se encuentren en un rango de 5-15° C, caso contrario ocurre con temperaturas superiores a los 25° C debido a que afecta la virulencia, duración y sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos (Hazir et al. 2004, Rojas 2018).

#### **2.6.2.2.4 Textura del suelo**

Los nematodos entomopatógenos en suelos con textura arcillosa presentan una menor tasa de sobrevivencia mientras que en los arenosos se favorece el desplazamiento de los juveniles infectivos (Hazir et al. 2004, McClure et al. 2011). Lo anterior, debido a que la porosidad influye, cuanto más pequeños sean los poros habrá menos infiltración de agua y oxígeno, por ende mayor impacto en el desplazamiento y supervivencia del microorganismo (Reyes 2009, McClure et al. 2011).

#### **2.6.2.3 Métodos de reproducción**

A lo largo de los años desde el descubrimiento de los nematodos entomopatógenos se han investigado diversos métodos de reproducirlos, por lo que ahora se enfocan en la reproducción *in vivo* e *in vitro* (Hazir et al. 2004, Kikuta et al. 2008, Alvarado 2012).

##### **2.6.2.3.1 Reproducción *in vivo***

En este método son utilizados hospederos con gran susceptibilidad a los NEPs, en la actualidad se usan larvas tanto de *Galleria mellonella* como de *Tenebrio molitor* ya que estos además de ser susceptibles a casi todos los nematodos también son fáciles de criar, hay gran disponibilidad y se pueden producir mayor cantidad de estos microorganismos; de este modo para la recolección de los juveniles infectivos se debe

realizar con trampas White (Boff et al. 2000, Shapiro-Ilan et al. 2002, Alvarado 2012, McMullen y Patricia Stock 2014).

Como parte de los beneficios que tiene el método in vivo es que no es necesario personal con alta experiencia, además de realizarse a un bajo costo sin necesidad de infraestructuras altamente tecnificada, sin embargo los nematodos tienen períodos muy cortos de almacenamiento por lo que en reproducciones masivas no es eficiente (Shapiro-Ilan et al. 2002, Hazir et al. 2004, Alvarado 2012).

#### **2.6.2.3.2 Reproducción *in vitro***

Es una técnica en la que se obtienen mejores rendimientos, sin embargo requiere de una inversión alta ya que se necesitan de diversos medios sólidos como arcillas, carbón activado, gel de alginato, además de medios líquidos como agar peptona-glucosa en los que se han obtenido volúmenes que rondan los 80 000 L de juveniles infectivos de *Steinernema*, sin embargo los nematodos del género *Heterorhabditis* no han tenido el mismo éxito (Hazir et al. 2004, Kikuta et al. 2008, McMullen y Patricia Stock 2014).

#### **2.6.2.4 Aplicación de NEPs**

En la actualidad el mercado de los productos que tiene como base nematodos entomopatógenos se encuentran en forma de polvos mojables, gránulos dispersables, pastas sobre esponjas y vermiculitas y pueden ser aplicadas a nivel de suelo o foliar con sistemas de riego o equipo de aspersión de agroquímicos (Hazir et al. 2004, Atwa 2014). En el momento en que el nematodo llegue a suelo o follaje busca al hospedero pero esto puede ser desventajoso ya que se ve interrumpido por las condiciones climáticas, además de que requiere mayor volumen de agua para su aplicación (Boff et al. 2000, Vashisth et al. 2013).

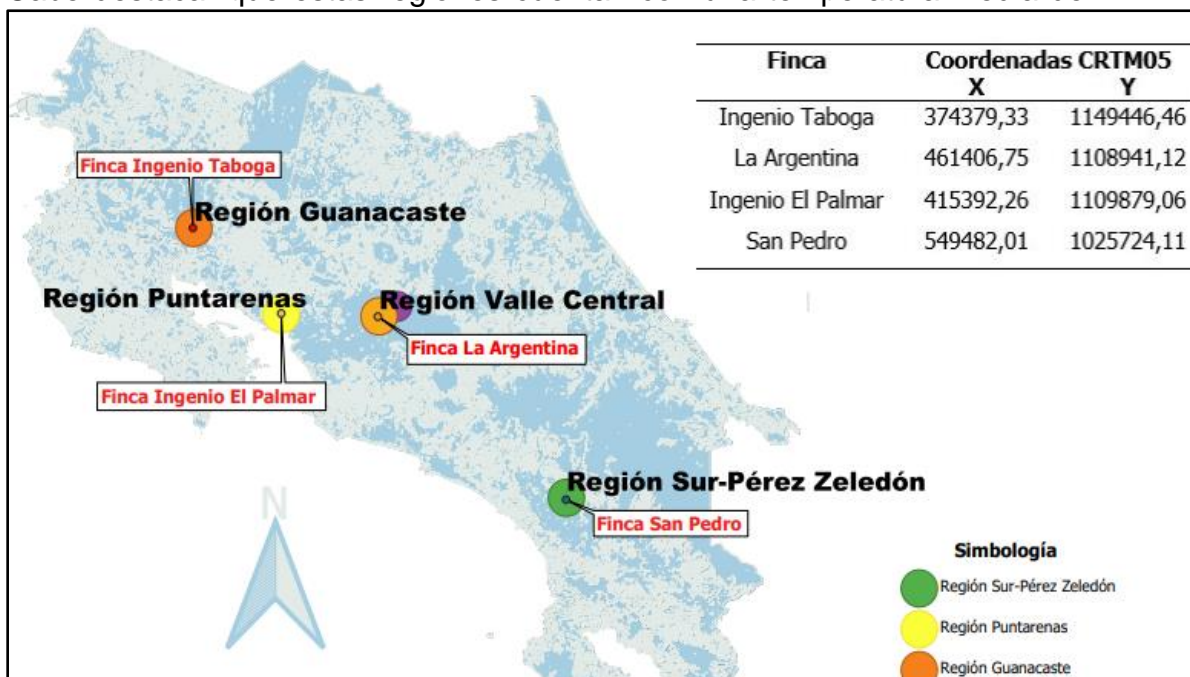
Otro método es la encapsulación con alginato de calcio en solución de  $\text{CaCl}_2$  el cual logra aumentar la eficiencia y la duración de los nematodos durante su almacenamiento y aplicación (Atwa 2014, Rojas 2018). Las cápsulas realizan una protección de los NEPs de diversas condiciones y disminuye la movilidad de los JI para que estos conserven energía y sea aprovechada en el momento de infectar el insecto y que a su vez tengan persistencia en el suelo (Vashisth et al. 2013, San-Blas 2013). Concluyendo

con lo anterior, esta técnica genera mayores beneficios por la facilidad de transporte, almacenamiento, manejo y aplicación, además de permitir mezclar con productos químicos y reducir la cantidad de agua (Hazir et al. 2004, Rojas 2018).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación

La investigación se llevó a cabo en tres etapas, se inició con muestreos de suelo en cuatro regiones cañeras las cuales fueron Pérez Zeledón en Finca San Pedro, Finca Ingenio El Palmar en Puntarenas, mientras en el Valle Central se muestreó Finca La Argentina y en la Región de Guanacaste se realizó en Finca Ingenio Taboga (Figura 5). Cabe destacar que estas regiones cuentan con una temperatura media de 22-27° C,



**Figura 5.** Distribución de fincas cañeras muestreadas por región.

Fuente: Elaboración propia, utilizando las aplicaciones Geo Tracker y QGIS 3.10

20-27° C , 25-29° C, 26-28° C y una precipitación anual media de 2400-4300 mm, 1450-3900 mm, 1100- 2900 mm y 1100- 2600 mm respectivamente (Chaves y Bermúdez 2012, Chaves y Chavarría 2012, LAICA 2021).

Respecto a la segunda y tercera etapa se realizó en el Laboratorio de Investigación y Control de Calidad e invernadero respectivamente del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) el cual pertenece a la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA), ubicado en Santa Gertrudis Sur, Grecia, Alajuela, Costa Rica, con las coordenadas CRMT05 X: 470048,88 Y: 1113524,51. Además tiene una altura media de 1014 msnm, con una precipitación promedio anual de 2000 a 2500 mm, una temperatura promedio anual de 17 a 22°C y una humedad relativa del 85% (Arce Chaves et al. 2015).

### **3.2 Periodo de estudio**

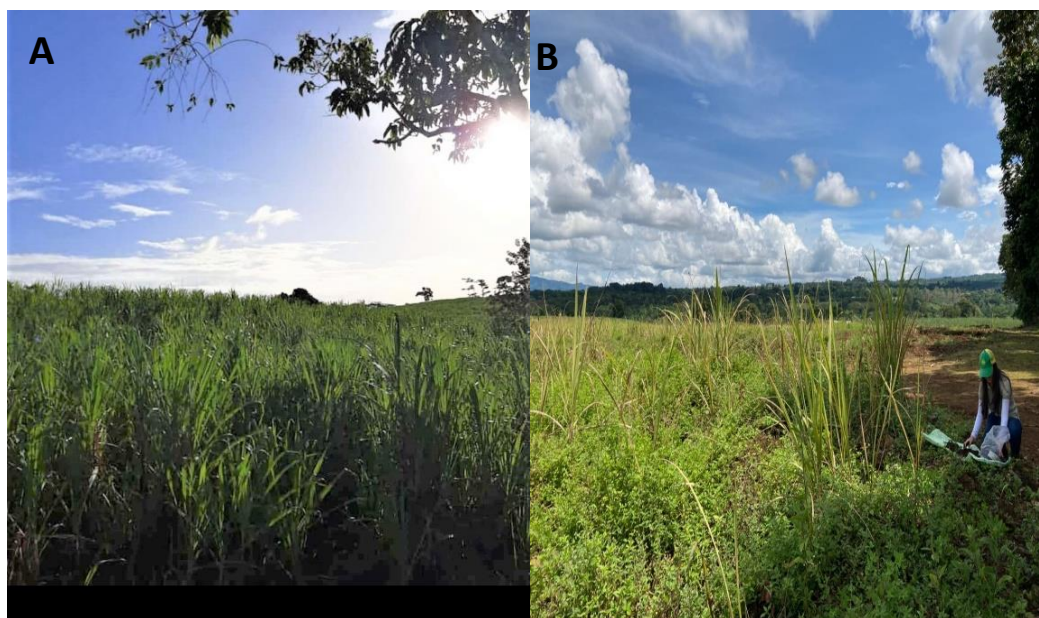
El periodo de estudio abarcó desde junio del año 2021 hasta febrero del 2022, definiéndose en semanas abarcó desde la 23 del 2021 hasta la semana 06 del año 2022. A partir de la semana 23 hasta la 34 se realizaron muestreos de suelo en cuatro regiones cañeras y las debidas extracciones de nematodos de dichos muestreos. A partir de la semana 35 hasta la 40 se continuó con la reproducción de los nematodos obtenidos para proseguir con las pruebas a nivel de laboratorio con el fin de conocer los aislados de nematodos más aptos y eficientes. Posteriormente desde semana 42 se evaluaron los aislados en invernadero para conocer la eficiencia de estos con plántulas de caña de azúcar y las respectivas larvas de joboto.

### **3.3 Muestreo de suelos**

En cada una de las fincas estudiadas (Figura 5) fueron seleccionados dos hábitats según la vegetación: cultivo (caña de azúcar) y aledaño (bordes, área boscosa) (Figura 6). En cada uno de estos hábitats se seleccionaron tres puntos de muestreo, los cuales



estaban separados por 100 metros, cabe destacar que en cada uno de los puntos se tomó una muestra de 3kg de suelo, cada una constaba de 3 submuestras aleatorias equidistantes a 3 metros una de la otra a una profundidad de 20 a 30cm para un total de 24 muestras.



**Figura 6.** Hábitats en los que se realizaron los muestreos. A) Plantación de caña de azúcar; B). Zonas aledañas a la plantación.

Las muestras de suelo fueron transportadas en hieleras y se dividieron en cuatro partes, ya que se utilizó para el análisis de pH y textura realizados en el Laboratorio de Suelos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, análisis de respiración microbiana trasladadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (UCR) y para el aislamiento de nematodos entomopatógenos en el Laboratorio de Investigación y Control de Calidad de DIECA.

### **3.4 Características del hábitat: análisis fisicoquímicos y microbiológico**

Los análisis fisicoquímicos realizados fueron el pH y textura, en el caso del primero se agregaron 25 gramos de suelo seco tamizado de cada muestra con 25 ml de agua destilada (proporción de suelo y agua 1:1) en un beaker de 50 ml, seguidamente se procedió a remover la muestra de suelo-agua con una espátula acanalada durante un

minuto y se dejó reposar por tres minutos, lo anterior tuvo tres repeticiones y se dejó decantar hasta que se formara un sobrenadante a los cinco minutos. Ocurrido lo anterior, se procedió a realizar tres mediciones de pH por muestra con un pH-metro marca Ohaus serie ST20 el cual previamente fue calibrado con soluciones buffer.

En el caso del análisis de textura, en un frasco de licuadora se agregaron 40 gramos de suelo seco tamizado de cada muestra, 10 ml de disolución dispersante de hexametáfosfato de sodio y 200 ml de agua destilada y se procedió a licuar durante dos minutos, posteriormente se trasvasó a una probeta y se aforó a 1000 ml con el hidrómetro, una vez aforado se agitó fuertemente durante 30 segundos y se dejó reposar durante 40 segundos para leer con el hidrómetro y tomar la temperatura, finalmente se procedió a tomar las mediciones nuevamente dos horas después. De acuerdo con lo anterior, para asignar la textura se utilizó el Triángulo de Texturas (Bouyoucos 1962), en el caso de los cálculos fueron realizados con las siguientes formulas:

$$\% \text{ suspensión} = (\text{lectura a los 40 segundos} \times 100) / \text{peso de la muestra}$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - \% \text{ suspensión}$$

$$\% \text{ Arcilla} = (\text{lectura a las 2 horas} \times 100) / \text{peso de la muestra}$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - \% \text{ Arena} - \% \text{ Arcilla}$$

Finalmente, para la respiración microbiana las muestras de suelo de cada región fueron enviadas para su análisis al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

### **3.5 Material experimental y Universo de estudio**

Para el ensayo se utilizó en la primer y segunda etapa las condiciones de laboratorio, en el caso de la primera se usaron 756 larvas de *Galleria mellonella* como método cebo para obtener los nematodos de las muestras de suelo y una cantidad igual para determinar la infección de los nematodos en estas, para la segunda y tercera se utilizaron 250 larvas de *Phyllophaga* spp., cabe destacar que estas se encontraban en su tercer instar (L3). En el caso de la tercera etapa se realizó en invernadero, donde las

larvas se encontraban con plántulas de caña de azúcar y con sistema de riego para mantener la humedad del sustrato.

### **3.6 Área experimental y unidad experimental**

En la primer y segunda etapa el área experimental se desarrolló en el Laboratorio de Investigación y Control de Calidad ya que, en el caso de la primera se trasladaron las muestras de suelo a este para proceder con la extracción de nematodos entomopatógenos mediante el método de larva cebo, mientras en la segunda se utilizaron 250 cajas circulares de poliestireno cristal las cuales contenían una larva L3 de *Phyllophaga* spp. ya que estas al encontrarse juntas pueden causarse daño entre las mismas, estas se dividieron en 10 tratamientos, lo que indica que cada tratamiento constaba de 25 cajas que a su vez se dividieron en cinco grupos con cinco unidades experimentales cada uno. Cada caja de poliestireno cristal estaba rotulada según el tratamiento que se le asignó, además de la fecha en que se inició el experimento, cabe destacar que cuando se inició con el experimento se nombró con un código de acuerdo con las siglas de la región, número de muestra y sitio de muestreo (aledaño o cultivo).

En el caso de la tercera etapa se realizó en un invernadero cerrado con una medida de 5m x 25m (125 m<sup>2</sup>), en el cual se encontraron 50 potes (con capacidad de volumen para 6 litros), de los cuales 45 fueron utilizados para probar tres distintas dosis y tres aislados seleccionados en la segunda etapa (tratamientos), los cinco restantes fueron control. Cada uno de los potes (0,0279 m<sup>2</sup>) contenían cinco larvas L3 de *Phyllophaga* spp. y una plántula de caña de azúcar; para la adecuada identificación se rotuló con la fecha en que se aplicó el tratamiento (los aislados) y la información de este (código de aislado y dosis respectiva).

### **3.7 Aislamiento y cría de nematodos**

Para la extracción de nematodos entomopatógenos, se utilizó la técnica de larva cebo como método de aislamiento (Bedding y Akhusrt 1975), con larvas del último instar de *Galleria mellonella* con tamaños de 1,5 cm. Fueron colocados 500 gramos de suelo y siete larvas en cada uno de los 18 recipientes de plástico de cada región (seis por repetición), se removieron piedras, material vegetal y otros residuos con el fin de evitar el aumento de microorganismos saprófitos. Los suelos con ausencia de humedad

fueron rociados con agua estéril, manteniéndose en temperatura ambiente; a cada recipiente se le colocó la respectiva tapa con rotulación, se introdujeron en una bolsa plástica y se les invirtió la posición con el propósito de inducir movilidad en las larvas (Figura 7).



**Figura 7.** Método de aislamiento de nematodos entomopatógenos con la técnica larva cebo.

Cada recipiente fue revisado de cinco a siete días después de depositar las larvas, a fin de extraer las que murieron durante el proceso y presentaban signos de infección por nematodos entomopatógenos. Las larvas muertas fueron lavadas con agua destilada para quitar los restos de suelo y cloro al 1% para su desinfección, a su vez se colocaron en papel filtro para eliminar la humedad; seguidamente, se colocaron en trampas White modificadas (Kaya y Stock 1997) para el aislamiento de los nematodos entomopatógenos. Para realizar las trampas White (Figura 8) se vertieron 10 ml de agua destilada en la base de una placa Petri con un diámetro de 10 cm y se colocó sobre ésta un papel filtro Whatman 1 con porosidad de 11 $\mu$ m, en este se situó el cadáver de la larva; estas trampas se revisaron durante siete días, en caso de que la muerte se debiera a la infección por nematodos entomopatógenos, los juveniles infectivos

emergían del cadáver hacia el agua con el fin de buscar humedad para su sobrevivencia.



**Figura 8.** Trampa White utilizada para el aislamiento de nematodos entomopatógenos.

Los nematodos fueron recolectados en un beaker de 50 ml a temperatura ambiente, se les realizó tres lavados con agua destilada, cabe destacar que en el último se dejaron reposar para que precipitaran. De cada aislado se procedió con la multiplicación; para ello en una placa Petri se colocó un papel filtro Whatman 1 con porosidad de  $11\mu\text{m}$  y cinco larvas de *Galleria mellonella*, las cuales se humedecieron con 2 ml de la solución de nematodos para infectarlas. Los cadáveres fueron colocados a las 72 horas nuevamente en una Trampa White para continuar con el procedimiento ya mencionado, a la vez se ratificaron los síntomas de infección por nematodos entomopatógenos como la coloración particular y la ausencia de putrefacción.

### **3.7.1 Identificación de nematodos entomopatógenos**

Para identificar los nematodos entomopatógenos aislados a nivel de género, se realizó de acuerdo con los síntomas y la coloración mostrada en las larvas muertas de *G. mellonella*, las cuales no debían presentar signos de descomposición. De acuerdo

con lo anterior, si la infección se debía a nematodos las larvas mostraban flacidez, en caso del género *Steinernema* los cadáveres mostraban una coloración ocre o tipo marrón; y los del género *Heterorhabditis* la coloración era rojiza (Kaya y Stock 1997, Rosa et al. 2000).

### **3.8 Evaluación de patogenicidad de los nematodos entomopatógenos en laboratorio**

Para continuar a la segunda etapa, primeramente se debía conocer la cantidad de nematodos por mililitro (ml) para determinar la dosis y aplicar cada una de los aislados, para ello se colocaron tres muestras de 2 µL de la solución de nematodos en un portaobjetos para que se realizará un conteo en el microscopio con un lente objetivo de 40X, de acuerdo con ese resultado se calculó para cada uno de los aislados la concentración de juveniles infectivos y de esa manera ajustar la dilución a 1000 NEPs por mililitro con la fórmula de Woodring y Kaya (1988):

$$S = N * \frac{1}{M} * (X + 1)$$

S = Concentración (nematodos/ml) solución inicial.

N = Número de nematodos observados en el microscopio en el conteo.

M = Número de mililitros utilizados en el conteo.

X+1 = Factor de dilución.

#### **3.8.1 Obtención de larvas de *Phyllophaga* spp.**

Las larvas de tercer instar se obtuvieron mediante muestreo en una finca cañera perteneciente al Ingenio El Palmar (Pitahaya, Puntarenas), estas fueron acondicionadas individualmente con suelo en cajas de poliestireno cristal (6 cm de diámetro) y fueron trasladadas a DIECA manteniéndose en cajas de cartón en condiciones frescas, sin interferencia de luz directa o alguna posible contaminación; además se les colocó una rodaja de zanahoria para su alimentación.

#### **3.8.2 Aplicación de aislados de nematodos entomopatógenos**

Teniendo las 250 larvas de *Phyllophaga* spp. en su respectivas cajas y con rodajas de zanahoria, se procedió a dividir las 25 larvas de cada tratamiento en cinco subgrupos

los cuales contenían cinco unidades muestrales cada uno; seguidamente se aplicaron los aislados de nematodos entomopatógenos con un aspersor de 100 ml directamente sobre las larvas, cabe destacar que cada una de estas debía infectarse con 2 ml de la dilución de NEPs a una concentración de 1000 NEPs/ ml, lo anterior al aplicarse la siguiente la fórmula de Woodring y Kaya (1988):

$$C = \frac{A * B}{D}$$

A: volumen inicial de concentración conocida para diluir

B: número de nematodos/ ml en el volumen inicial para diluir

C: volumen final (ml) de la nueva dilución.

D: número de nematodos/ ml en el volumen final de la nueva dilución.

Una vez aplicados los aislados, las larvas fueron colocadas en una caja de cartón para evitar el ingreso de la luz; estas fueron evaluadas cada 24 horas durante 28 días para determinar la mortalidad y la virulencia (daño causado a través del tiempo), en este caso se extrajeron las larvas muertas y se colocaban individualmente en una trampa White siguiendo el mismo procedimiento realizado con las larvas de *G. mellonella* infectadas, de esta manera se determinó si la muerte fue a causa de los nematodos entomopatógenos o por otros factores. Lo anterior es fundamental, debido a que con dichos resultados se seleccionaron los tres aislados con mayor patogenicidad y para ser aplicados a nivel de invernadero.

### **3.9 Efectividad biológica de los nematodos entomopatógenos en invernadero**

Respecto a la tercer etapa, teniendo las 250 larvas de *Phyllophaga* spp. y conociendo la concentración de los tres aislados seleccionados se procedió a aplicar en tres dosis distintas, para ello se utilizó una bomba manual con capacidad de 3L, se aplicaron 200 ml de dilución para una correcta distribución en el suelo de cada pote, mientras en el caso del control se aplicó únicamente 200 ml de agua por pote.

De acuerdo con lo anterior, las larvas fueron evaluadas durante 28 días para determinar el porcentaje de mortalidad y el tiempo en que cada tratamiento causó

mortalidad. Los cadáveres fueron colocados individualmente en trampas White para verificar si la muerte fue causada por los nematodos entomopatógenos.

### **3.10 Repeticiones**

Para la primera etapa, se realizaron tres repeticiones para cada una de las muestras de suelo de las regiones cañeras con el método de larva cebo, es decir cada repetición contenía 24 muestras (seis por región). En el caso de la segunda etapa, constaba de cinco repeticiones (cada una con cinco unidades muestrales) para cada uno de los 10 tratamientos (aislados de nematodos entomopatógenos).

Por otra parte, considerando que se seleccionaron tres aislados eficientes de la etapa anterior, se continuó a la tercera etapa y se hicieron cinco repeticiones por cada aislado en tres dosis distintas, más un control de cinco repeticiones.

### **3.11 Descripción de tratamientos**

El estudio constaba de tres etapas, cada una de estas tuvo sus respectivos tratamientos, en el caso de la primera el tratamiento fueron las 24 muestras de suelo por región, ya que consistía en el método de larva cebo para conocer la presencia o ausencia de nematodos entomopatógenos en estas. En el caso de la segunda etapa, fueron los aislados de nematodos entomopatógenos obtenidos de las muestras de suelo, a una dosis de 2 ml de dilución por larva, a una concentración de 1000 NEPs/ml. Lo anterior se describe en el Cuadro 2.



**Cuadro 2.** Tratamientos aplicados en larvas L3 de *Phyllophaga* spp. a nivel de laboratorio, DIECA.

<b>Código de Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
1A-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra uno tomada de zona aledaña a la plantación de caña de azúcar en la Región Sur en Pérez Zeledón.
2A-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra dos tomada de zona aledaña a plantación de caña de azúcar de la Región Sur en Pérez Zeledón.
3A-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra tres tomada de zona aledaña a plantación de caña de azúcar de la Región Sur en Pérez Zeledón.
1C-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra uno tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región Sur en Pérez Zeledón.
2C-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra dos tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región Sur en Pérez Zeledón.

<b>Código de Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
3C-PZ	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra tres tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región Sur en Pérez Zeledón.
2A-GTE	Aislado de NEPs del género <i>Heterorhabditis</i> proveniente de la muestra dos tomada de zona aledaña a la plantación de caña de azúcar de la Región de Guanacaste.
3C-VC	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra tres tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región del Valle Central
1C-PTS	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> proveniente de la muestra uno tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región de Puntarenas.
2C-PTS	Aislado de NEPs del género <i>Steinernema</i> . proveniente de la muestra dos tomada de la plantación de caña de azúcar de la Región de Puntarenas.

Respecto a los tratamientos de la tercera etapa, se seleccionaron de la etapa anterior los tres aislados con mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp., los cuales procedían de la Región Sur (Pérez Zeledón) con los códigos 1A-PZ, 3A-PZ y 2C-PZ, estos fueron aplicados en 200 ml de dilución a una concentración de 1000

NEPs/ ml en tres dosis distintas:  $2 \times 10^5$  NEPs/  $m^2$ ,  $3 \times 10^5$  NEPs/  $m^2$  y  $4 \times 10^5$  NEPs/  $m^2$ ; además en esta fase se contempló el control al cual se le aplicaron únicamente 200 ml de agua por pote.

### **3.12 Variables de respuesta**

En cuanto a las variables de respuesta en el caso de la primer etapa se determinó la ausencia o presencia de nematodos entomopatógenos en las diversas muestras de suelo de cada una de las regiones muestreadas al utilizar el método de larva cebo, en caso de que las larvas de *G. mellonella* fuesen infectadas por dichos nematodos se determinaba como muestra positiva a estos y de acuerdo a las características distintas (coloración, apariencia). Aunado a lo anterior, a las muestras de suelo se les realizó el análisis de textura, pH y respiración microbiana para determinar la relación con la presencia y ausencia de los nematodos en cada una de estas.

Por otra parte, en la segunda y tercer etapa se midió la virulencia (daño causado a través del tiempo) y la patogenicidad (porcentaje de mortalidad); estas variables se determinaron observando las larvas de *Phyllophaga* spp. cada 24 horas durante 28 días, para ello se cuantificaron las muertas diarias y se colocaron los cadáveres en trampas White para determinar si fue a causa de los aislados de nematodos entomopatógenos; en el caso de la tercer etapa se evaluaron dichas variables a tres distintas dosis de los aislados ya mencionados.

### **3.13 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el paquete InfoStat (Di Rienzo et al. 2020). En el caso de la presencia y ausencia de nematodos con relación a regiones y hábitats se empleó la prueba de chi cuadrado ( $X^2$ ). Aunado a ello se aplicaron modelos lineales generales y mixtos para analizar el pH, tasa de respiración y porcentajes de textura y las interacciones de acuerdo con la región y hábitat. El ANOVA fue aplicado para evaluar las diferencias estadísticas en cuanto a la distribución de porcentajes de mortalidad y virulencia por tratamientos, esto en las dos últimas etapas para cada una de las variables. Las diferencias entre las medias se analizaron mediante la prueba LSD de Fisher con corrección de los valores p de Bonferroni y un nivel de significancia de confiabilidad del 0,95.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Presencia y ausencia de nematodos a partir de muestras de suelo de dos hábitats en diversas regiones cañeras

A partir de las 24 muestras analizadas, se obtuvieron aislados de nematodos entomopatógenos en el 42 % (10 muestras), de las cuales el 60 % (6 muestras) fueron obtenidas de la Región Sur en Pérez Zeledón, el 20 % de Puntarenas y 10 % tanto para Guanacaste como para el Valle Central (Cuadro 3). Lo anterior indica un alto porcentaje de aislados al compararse con otros estudios en diversas regiones a nivel mundial, como los realizados por Lezama-Gutiérrez et al. (2001) y Stock et al. (2008) con resultados entre 3 % y 7 % e incluso de un 14 % (Campos et al. 2007). Por otra parte, se asemejan a los obtenidos en Colombia por Caicedo (2004) quién obtuvo 33 % y 45 % de aislados de dos diversos sitios.

Al analizar si la región y hábitat de procedencia de las muestras tuvo efecto sobre la presencia de NEPs, se encontraron diferencias significativas respecto a la región ( $p=0,0087$ ), sin embargo no para el hábitat ( $p=0,4067$ ). De acuerdo con lo mencionado, dicha diferencia se puede deber a la preferencia de los nematodos a ciertas características edáficas (Hazir et al. 2004, McClure et al. 2011), condiciones ambientales como: humedad (Rojas 2018), temperatura (Alvarado 2012), ya que cada región tiene diferencias entre estas; siendo en este estudio la Región Sur la que obtuvo mejores condiciones ya que el 100 % de las muestras tuvo presencia de nematodos.

Aunado a lo anterior, estudios realizados por Hara et al. (2002), Hazir et al. (2004) y Mekete et al. (2005) indicaron que los nematodos tienen una extensa distribución y su presencia puede variar de acuerdo con cada una de las condiciones propias del sitio. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que hubo aislados de todas las regiones muestreadas, incluso de Guanacaste, siendo esta región caracterizada por poseer suelos vertisoles; caso contrario ocurrió en el estudio realizado por Mekete et al. (2005), ya que los muestreos realizados en suelos de dicho orden no tuvieron presencia de nematodos entomopatógenos.

En cuanto a la relación de los aislados y el hábitat de procedencia, pese a no tener diferencias a nivel estadístico ( $p=0,4064$ ), se debe recalcar que seis (60 %) de estos

fueron obtenidos de las muestras provenientes del cultivo, mientras el 40 % restante provenían de sitios aledaños (Cuadro 3). Lo anterior implica que pese a que las plantaciones de caña de azúcar sean ambientes alterados por el hombre, incluso con aplicaciones de agroquímicos, no es una limitante para la presencia de nematodos entomopatógenos. Lo anterior se debe según Madrigal (2001), a la alta resistencia de estos organismos a productos químicos y a condiciones ambientales adversas; incluso se han evaluado efectos de diversos insecticidas (indoxyzcarb, imidacloprid y dinotefuran) en diferentes concentraciones sobre las especies *Heterorhabditis sonorensis* y *Steinernema riobrave* y no hubo afectaciones en la sobrevivencia de estos, pero si en cuanto a la virulencia (Navarro et al. 2014). Complementando lo anterior, Palomo y García (2000) analizaron y determinaron factible la compatibilidad de los nematodos entomopatógenos con el oxamilo, pese a reducirse en un 10 % la capacidad de infección y la reproducción de los adultos.

Por otra parte, los resultados obtenidos no tienen concordancia con lo encontrado por Doucet et al. (2001), Mráček et al. (2005) y Bal et al. (2014) ya que determinaron mayor presencia de nematodos entomopatógenos en cercas vivas y bosque que dentro de la plantaciones, esto ya que son suelos con más nutrientes y diversidad de organismos relevantes; a diferencia de lo mencionado esta investigación realizó los muestreos en los bordes de la plantación por lo que son sitios de menor densidad, con una diversidad y conservación reducida respecto al bosque. Finalmente, se debe considerar que los nematodos entomopatógenos están presentes en diversos hábitats desde plantaciones, bosques e incluso praderas (Lalramliana y Yadav 2010, Khatri-Chhetri et al. 2010); lo anterior se atribuye a la distribución que tienen dichos organismos en el suelo ya que tienden a unirse por parches y de acuerdo con la agregación que tomen los insectos que estos parasitan (Mráček y Becnár 2000, Campos et al. 2007, Hueso et al. 2015).

**Cuadro 3.** Cantidad de muestras con presencia y ausencia de nematodos entomopatógenos según el hábitat y la región cañera.

Región ( $\chi^2 = 0,0087$ )	Hábitat ( $\chi^2 = 0,4064$ )	Nematodos entomopatógenos	
		Presencia	Ausencia
Guanacaste	Aledaño	1	2
	Cultivo	0	3
Puntarenas	Aledaño	0	3
	Cultivo	2	1
Sur (Pérez Zeledón)	Aledaño	3	0
	Cultivo	3	0
Valle Central	Aledaño	0	3
	Cultivo	1	2
Total		10	14

#### 4.1.1 Caracterización del hábitat

En el Cuadro 4 se observa el promedio ( $\pm$  DE) de las variables medidas en las diversas muestras de suelo; en cuanto a la tasa de respiración presentaba valores mínimos y máximos de 30 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg y 117 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg por día respectivamente. Respecto al pH rondaba entre 4,6 y 7,5; mientras para el análisis de textura el porcentaje de arena se encontraba del 34 % hasta el 66 %, el de arcilla desde 21 % hasta 45 %, finalmente el limo abarcó desde el 11 % y valores máximos del 30 %. De lo anterior se puede mencionar que los valores promedio más altos de tasa de respiración y porcentaje de arena se encontraron en el hábitat aldeaño en la Región Sur (Pérez Zeledón) y los más bajos en Guanacaste de igual manera en el sector aldeaño; mientras en el caso del porcentaje de arcilla y limo tuvo variaciones de acuerdo con el hábitat de cada región (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Promedio ( $\pm$  DE) de las variables medidas en las muestras de suelo por región y hábitat.

Región/Hábitat	Guanacaste		Puntarenas		Sur (Pérez Zeledón)		Valle Central	
	Aledaño	Cultivo	Aledaño	Cultivo	Aledaño	Cultivo	Aledaño	Cultivo
Tasa Respiración (mg C-CO <sup>2</sup> /Kg día)	47,33 $\pm$ 13,27	36,67 $\pm$ 9,43	76,33 $\pm$ 16,74	67,66 $\pm$ 11,59	104,67 $\pm$ 16,74	69,33 $\pm$ 16,49	66,67 $\pm$ 5,44	72,33 $\pm$ 13,27
pH	5,83 $\pm$ 0,29	6,13 $\pm$ 0,21	6,71 $\pm$ 0,14	5,43 $\pm$ 0,17	6,43 $\pm$ 0,19	5,27 $\pm$ 0,25	5,43 $\pm$ 0,54	6,1 $\pm$ 0,04
Arena (%)	54 $\pm$ 5,14	53 $\pm$ 5,89	34 $\pm$ 3,12	58 $\pm$ 3,12	65 $\pm$ 2,04	66 $\pm$ 5,89	37 $\pm$ 4,24	51 $\pm$ 2,35
Arcilla (%)	31 $\pm$ 4,25	34 $\pm$ 4,71	36 $\pm$ 2,04	27 $\pm$ 1,18	24 $\pm$ 4,25	21 $\pm$ 4,71	45 $\pm$ 4,25	37 $\pm$ 2,04
Limo (%)	15 $\pm$ 2,04	13 $\pm$ 1,18	30 $\pm$ 3,12	15 $\pm$ 2,04	11 $\pm$ 2,36	13 $\pm$ 1,18	18 $\pm$ 0,36	12 $\pm$ 1,18

DE: Desviación estándar.

Respecto a la relación entre la presencia o ausencia de nematodos con las variables medidas por hábitat, se determinó que no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en cuanto al pH y la tasa de respiración (Cuadro 5). Tomando en consideración que el pH es uno de los factores determinantes para la persistencia de NEPs en el suelo, se debe destacar que estos organismos tienen amplia tolerancia a este factor (Doucet et al. 2001, Madrigal 2001), ya que como demostraron Kung et al. (1990) y Bal et al. (2014) un pH con valores cercanos a 10 provoca una disminución de sobrevivientes de nematodos, mientras de 4 a 8 no mostraron afectaciones; lo anterior se relaciona con este estudio, ya que las medias ( $\pm$  EE) del pH se encontraron entre  $5,43 \pm 0,21$  y  $6,20 \pm 0,26$  por lo que se acopla al rango mencionado. Por otra parte, los valores obtenidos de las muestras con presencia de nematodos fueron de  $6,20 \pm 0,26$  en hábitat alledaño y  $5,43 \pm 0,21$  para cultivo estos se asemejan a lo obtenido por Griffin et al. (1999), Hara et al. (2002) y Campos et al. (2007) donde se encontraron valores de 4,6 a 8,0.

Tomando en consideración la tasa de respiración, pese a no presentar diferencias significativas ( $p=0,1158$ ) respecto a la presencia y ausencia de nematodos, los valores

de media ( $\pm$  EE) más altos se obtuvieron de las muestras con presencia de ambos hábitats, en el caso de aledaño fue de  $91,00 \pm 10,69$  mg C-CO<sub>2</sub>/Kg por día y cultivo  $66,50 \pm 8,73$  mg C-CO<sub>2</sub>/Kg por día. De acuerdo con dichos resultados no hay concordancia con lo encontrado por Vidaurre et al. (2020) ya que demostró que existe una relación entre respiración y la presencia de nematodos; aunado a ello mencionó que valores bajos ( $< 0.20$  CO<sub>2</sub> g por día) de dicha variable generan una probabilidad del 80 % de tener ausencia de nematodos de ambos géneros (*Heterorhabditis* y *Steinernema*). Sustentando lo anterior, De Nardo et al. (2006) comprobaron que suelos con presencia de nematodos tuvieron más liberación de CO<sub>2</sub> a una tasa significativamente mayor respecto a los que tenían ausencia de estos; mientras De-Sabino et al. (2015) encontraron un aumento lineal en la concentración de CO<sub>2</sub> asociado a mayor presencia de nematodos, indicando incluso que para el género *Steinernema* dicha concentración fue superior en comparación a la obtenida con *Heterorhabditis*, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos, ya que en el caso de las muestras con presencia del primer género la tasa de respiración se encontró en un rango de 61 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg a 104 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg por día, mientras para *Heterorhabditis* esta variable resultó con un valor de 50 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg por día.

Finalmente, con los porcentajes de arena y arcilla hubo diferencias significativas ( $p=0,0061$ ), caso contrario con los de limo respecto a la presencia y ausencia de nematodos (Cuadro 5), siendo los valores más altos de arena para presencia en aledaño y cultivo ( $64 \pm 3,59$  % y  $58 \pm 3,79$  % respectivamente) y los de arcilla para ausencia de nematodos ( $31 \pm 3,39$  % y  $29 \pm 1,76$  %); esto se debe a lo expuesto por Shapiro-Ilan et al. (2006), Reyes (2009), McClure et al. (2011) y El-Borai et al. (2012) sobre la textura y su interferencia en la persistencia, presencia y movilidad de los nematodos, ya que esta es quien determina el tamaño de los poros, además de la aireación y por ende la retención de humedad en el suelo; a ello se suma el consumo energético requerido por estos organismos para su desplazamiento (Mráček et al. 2005). Lo anterior, radica en que la movilidad y supervivencia de estos organismos se ven favorecidas en suelos con alto porcentaje de arena, caso contrario en los que presentan alto contenido de arcilla (Khatri-Chhetri et al. 2010, Toepfer et al. 2010, Shapiro-Ilan et al. 2011). Respecto a los valores obtenidos de limo, en estudios



realizados por Boemare (2002), Rosa et al. (2002) y Shapiro-Ilan et al. (2011) se encontró que mientras los valores de arena sean altos y los de arcilla bajos, el limo tiene la tendencia de no influir directamente sobre la actividad de los nematodos, tal y como los resultados obtenidos en este estudio, ya que los que se relacionaron estadísticamente con la presencia o ausencia de estos fueron los porcentajes de arena y arcilla (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Medias ( $\pm$  EE) de las variables medidas en las muestras de suelo por hábitat.

Hábitat	Nematodos	pH	Tasa de Respiración (mg C-CO <sup>2</sup> /Kg día)	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)
Aledaño	Presencia	6,20 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	91,00 $\pm$ 10,69 <sup>a</sup>	64 $\pm$ 3,59 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 4,15 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>
	Ausencia	6,05 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	61,13 $\pm$ 7,56 <sup>b</sup>	48 $\pm$ 4,16 <sup>b</sup>	31 $\pm$ 3,39 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>
Cultivo	Presencia	5,43 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	66,50 $\pm$ 8,73 <sup>ab</sup>	58 $\pm$ 3,79 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 2,43 <sup>b</sup>	20 $\pm$ 1,62 <sup>b</sup>
	Ausencia	5,98 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>	61,83 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	44 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	29 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 2,31 <sup>b</sup>

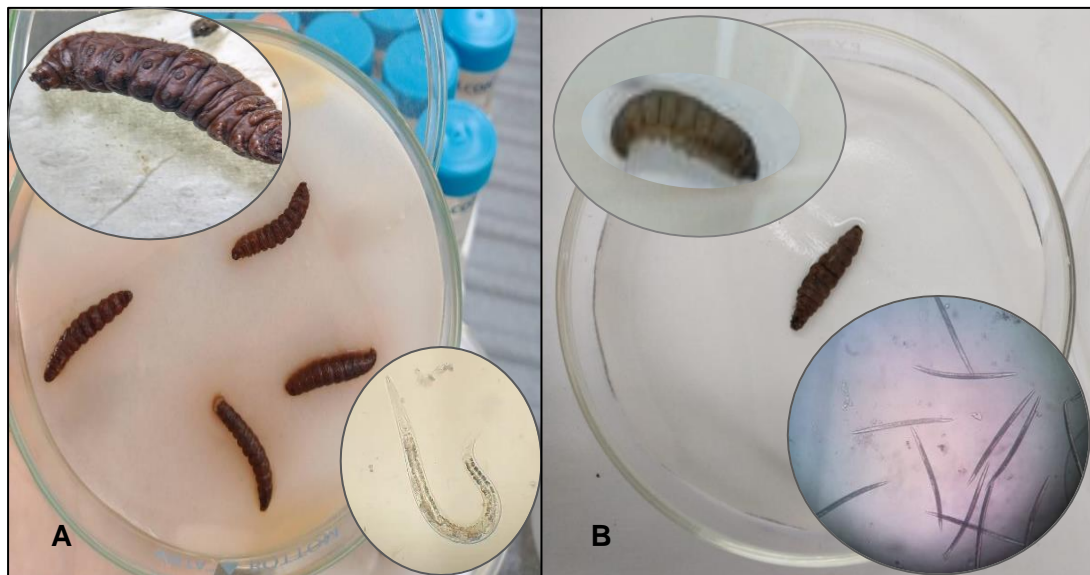
EE. Error estándar. a-b Diferentes letras indican diferencias entre cada una de las variables. P<0,05.

#### 4.1.2 Aislados a partir de las muestras de suelo

Para el aislamiento de nematodos entomopatógenos primeramente se determinó la prueba de patogenicidad de cada uno en el último estado larval de *G. mellonella* para cumplir con los postulados de Koch, mostrando porcentajes de mortalidad superiores al 85 % (Anexo 1). Seguidamente, se dio la identificación de los nematodos entomopatógenos la cual fue realizada a nivel de género de acuerdo con los síntomas y coloración mostradas en dichas larvas, de esa manera se obtuvo el género *Heterorhabditis sp* en una muestra (10 %) proveniente de Guanacaste en el hábitat aledaño y el 90 % restante de *Steinernema sp* en las otras tres regiones; de estas el 67 % fueron obtenidas dentro del cultivo y un 33 % de aledaño, lo anterior comprueba lo mencionado por Caicedo (2004), Stock et al. (2008) y Hueso et al. (2015) sobre la dificultad de aislar los del género *Heterorhabditis*, incluso por ello existen menos especies de este en comparación a *Steinernema*.

De acuerdo con lo anterior, se dio la identificación del aislado perteneciente al género *Heterorhabditis* ya que, las larvas presentaron una consistencia turgente y una coloración rojiza (Figura 9), esto concuerda con lo mencionado por Kaya y Stock (1997), Rosa et al. (2000), Boemare (2002), White y Torres (2009) y Andaló et al. (2010), ya

que la coloración rojiza característica de este nematodo es proporcionada por la bacteria con la que posee simbiosis (*Photorhabdus*). Por otra parte, los nueve aislados restantes se agruparon en el género *Steinernema*; esto debido a que las larvas de *G. mellonella* mostraron flacidez en su consistencia y un color ocre-cremoso (Figura 9) y dicha sintomatología según lo encontrado por Kaya y Stock (1997), Boemare (2002) Rodríguez et al. (2012), es característico de este; además los cadáveres no tuvieron pudrición ni olor fétido esto debido a la funcionalidad de las bacterias simbiotes de segregar antibióticos que no permitan el crecimiento de organismos antagonistas (Boemare 2002, Goodrick y Clarke 2007, Stock et al. 2018).



**Figura 9.** Infección de larvas de *G. mellonella* con nematodos de los géneros. A) *Heterhorabditis*; B) *Steinernema*.

#### 4.2 Potencial patogénico de aislados de nematodos entomopatógenos en laboratorio

Primeramente, al evaluar los aislados a una dilución de 2 ml con una concentración de 1000 NEPs/ ml por larva se determinó una mortalidad total de 17 %, de esta el 88 % fue producto de los nematodos obtenidos de la Región Sur (Pérez Zeledón), un 8 % de la Región de Puntarenas y 2% tanto los procedentes de Guanacaste como los del Valle Central; de acuerdo con lo anterior el análisis de varianzas mostró diferencias significativas entre regiones ( $p= 0,0001$ ); esto puede deberse a lo expuesto por Doucet

et al. (2001), Lalramliana y Yadav (2010) y Hueso et al. (2015) sobre una mayor patogenicidad de los aislados de acuerdo con los niveles de adaptabilidad ya que varía según la región de procedencia y las condiciones de esta. En cuanto al hábitat de procedencia de los aislados, no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ); sin embargo entre tratamientos se observaron diferencias significativas respecto a la media ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp. (Cuadro 6), siendo los tratamientos 1A-PZ, 3A-PZ y 2C PZ del género *Steinernema* sp. los que causaron mayor mortalidad ( $32,00 \pm 4,82$  %,  $36,00 \pm 5,70$  % y  $40,00 \pm 5,83$  % respectivamente) dos del hábitat aledaño y uno del cultivo; lo anterior se diferencia de los resultados obtenidos por Gómez et al. (2001), De-Waal et al. (2011) y Sánchez et al. (2012) en pruebas a nivel de laboratorio, ya que las especies del género *Heterorhabditis* presentan mayor patogenicidad en larvas de *Phyllophaga* spp. respecto a *Steinernema*; además Madrigal (2001), Boemare (2002), De-Waal et al. (2011) y Sánchez et al. (2012) mencionan que dicha ventaja de *Heterorhabditis* puede deberse a que este cuenta con un diente dorsal el cual le brinda facilidad para entrar directo al hemocele del hospedero, pese a ello no asegura que se relacione con el potencial que tienen estos para el control biológico; por otra parte Koppenhöffer et al. (2008), Lalramliana y Yadav (2010), Shapiro-Ilan et al. (2011) y Torrini et al. (2020) han reportado potencial de *Steinernema* para invadir y causar la muerte de diferentes especies de *Phyllophaga* lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Aunado a lo anterior, la susceptibilidad del joboto va a depender del estadio larval en que se encuentre este (Koppenhöffer et al. 2006, Rodríguez et al. 2009). Al tener en cuenta el estado larval de *Phyllophaga* spp. se debe resaltar que en este caso fueron utilizadas las del tercer instar (L3), lo cual se puede comparar con lo obtenido por Koppenhöffer et al. (2008) al realizar evaluaciones de *Steinernema* a una concentración de  $2,5 \times 10^9$  NEPs/ha en larvas de segundo y tercer instar, demostrando que dicho género fue más eficaz en L3; mientras Gómez et al. (2001) demostraron que con suspensiones de 0,5 ml con 400 juveniles infectivos de *Steinernema* se obtuvo un 90 % de mortalidad en larvas L3 *Phyllophaga* spp.; a diferencia de lo mencionado anteriormente y lo obtenido en estos resultados Koppenhöffer et al. (2006), Melo-Molina et al. (2010) y El-Borai et al. (2012) encontraron que los estados larvales iniciales poseen una respuesta de defensa más baja que las

L3, por ende los porcentajes de mortalidad son más altos en estas, con ello concuerdan Grewal et al. (2004) y Rodríguez et al. (2009), ya que aseguran que las L3 son la etapa larvaria de mayor resistencia.

Al comparar el porcentaje de mortalidad obtenido por cada tratamiento (Cuadro 6), se determinó que el valor más alto fue el de 2C-PZ con un  $40,00\pm 5,83$  %, seguido por 3A-PZ ( $36,00\pm 5,70$  %) y 1A-PZ ( $32,00\pm 4,82$  %). Dichos resultados se asemejan a los encontrados por Caicedo (2004), Ansari et al. (2006), Koppenhöffer et al. (2006) y Shapiro-Ilan et al. (2006), ya que con aislados de *Steinernema* alcanzan mortalidades hasta del 49 % en larvas de *Phyllophaga* spp., mientras Koppenhöffer et al. (2008), Melo-Molina (2010) y Torrini et al. (2020) encontraron mortalidades superiores al 80 %. Lo anterior puede deberse al potencial con que cuenta cada aislado según su género y su procedencia (Lalramliana et al. 2010, Bal et al. 2014, Hueso et al. 2015) y la interacción con su respectiva bacteria simbiote (Goodrich y Clarke 2007, Ansari et al. 2008), ya que el nivel de toxicidad y multiplicación de dicha bacteria puede variar de un nematodo a otro (Ansari et al. 2018, Stock et al. 2008). Aunado a ello el estadio larval y el comportamiento de los jobotos para evitar la infección de nematodos (Koppenhöffer y Fuzy 2004), ya que se han desarrollado diversas conductas defensivas y cambios a nivel morfológico y fisiológico que no permiten la infección por nematodos como lo son: la defecación frecuente, espiráculos con ciertas estructuras, fuerte sistema inmune (Grewal et al. 2004, Ansari et al. 2008, Rodríguez et al. 2009).

**Cuadro 6.** Medias ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp. alcanzado a los 14 días, según el tratamiento aplicado en laboratorio.

<b>Código de Tratamiento</b>	<b>Género de NEPs</b>	<b>Mortalidad</b>
1A-PZ		32,00 $\pm$ 4,82 <sup>a</sup>
2A-PZ		12,00 $\pm$ 3,41 <sup>b</sup>
3A-PZ		36,00 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>
1C-PZ		12,00 $\pm$ 3,12 <sup>b</sup>
2C-PZ	<i>Steinernema</i>	40,00 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>
3C-PZ		16,00 $\pm$ 4,40 <sup>b</sup>
1C-PTS		8,00 $\pm$ 3,00 <sup>b</sup>
2C-PTS		4,00 $\pm$ 4,31 <sup>b</sup>
3C-VC		4,00 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>
2A-GTE	<i>Heterorhabditis</i>	4,00 $\pm$ 2,00 <sup>b</sup>

EE. Error estándar. a-b Diferentes letras indican diferencias entre cada una de las variables.  $P < 0,05$ .

Seguidamente, al evaluar el daño generado por los nematodos a las larvas de *Phyllophaga* spp. a través del tiempo (virulencia), se observó que pese a evaluarse durante 28 días, no se registraron muertes después del día siete (Cuadro 7). Aunado a lo anterior, con el análisis de varianza se determinó que los tratamientos 1A-PZ, 3A-PZ y 2C-PZ fueron diferentes significativamente ( $P < 0,05$ ) respecto a los siete restantes a las 96 horas desde la infección. Además, se puede mencionar que la media ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad de los tratamientos, alcanzó su nivel máximo a las 96 horas (siendo 2C-PZ el más alto 24,00 $\pm$ 2,25 %) a excepción de 1C-PTS y 2C-PTS que ocurrió a las 72 horas con valores de 8,00 $\pm$ 1,52 % y 4,00 $\pm$ 1,52 % respectivamente; esto puede deberse a lo indicado por Doucet et al. (2001), Lezama-Gutiérrez et al. (2001) y Lalramliana y Yadav (2010) sobre la movilidad y diferencia de velocidad de cada aislamiento para causar la muerte de su hospedero, debido a que cada uno tiene su tiempo de demora para penetrar las cutículas de sus hospederos (Madrigal 2001, Mráček et al. 2005, El-Borai et al. 2012) y por ende pasar a estado infectivo donde debe liberar la bacteria con la que tiene simbiosis (Boemare 2002, Goodrich y Clarke 2007, Ansari et al. 2018). Además, estas bacterias deben vencer el sistema de defensa con el que cuenta el hospedero, que dicho sea de paso es variable en cada larva (Doucet

et al. 2001, Goodrich y Clarke 2007), lo anterior puede justificar las diferencias que se dan en tiempo y mortalidad alcanzada por cada uno de los tratamientos en *Phyllophaga* spp. Los resultados del estudio demuestran que el tiempo requerido para que la mayoría de los tratamientos causen el máximo daño en larvas de *Phyllophaga* spp. es de cuatro días; esto se compara con lo determinado por Gómez et al. (2001), Andaló et al. (2010) y Shapiro-Ilan et al. (2011), siendo de tres a cinco días el tiempo necesario para alcanzar el mayor porcentaje de mortalidad; mientras en un estudio realizado por Rodríguez et al. (2009) evaluaron la mortalidad durante 30 días siendo este último el que obtuvo el porcentaje de mortalidad más alto (24 %); lo anterior se puede diferenciar con otras investigaciones en las que el mayor porcentaje de afectación de larvas L2 se dio en el día siete con aislados de *Heterorhabditis* (Lalramliana y Yadav 2010) y de nueve a diez días con *Steinernema* (Koppenhöffer et al. 2008, Toepfer et al. 2010), finalmente se han dado estudios en laboratorio donde aislados de la familia *Steinernematidae* causan la muerte del hospedero entre 28 y 48 horas en un 41 % (Campos et al. 2007, Hueso et al. 2015, Toepfer et al. 2010), mientras *Heterorhabditis* causa mortalidades del 40 % al 46 % entre las 40 y 86 horas posterior a la infección (Melo-Molina et al. 2010, De-Waal et al. 2011, Sánchez et al.2012).

**Cuadro 7.** Medias ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad causado a través del tiempo en larvas de *Phyllophaga* spp. según el tratamiento aplicado.

Tiempo/Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	7 días
1A-PZ	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	4,00 $\pm$ 1,95 <sup>bc</sup>	20,00 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 1,95 <sup>bc</sup>
2A-PZ	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	12,00 $\pm$ 1,95 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>
3A-PZ	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 1,95 <sup>bc</sup>	20,00 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	8,00 $\pm$ 1,95 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,95 <sup>c</sup>
1C-PZ	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 2,25 <sup>bc</sup>	8,00 $\pm$ 2,25 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>
2C-PZ	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	12,00 $\pm$ 2,25 <sup>b</sup>	24,00 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	4,00 $\pm$ 2,25 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>
3C-PZ	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 2,25 <sup>bc</sup>	8,00 $\pm$ 2,25 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>
2A-GTE	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	4,00 $\pm$ 2,42 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>
3C-VC	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	4,00 $\pm$ 2,42 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,4 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>
1C-PTS	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 1,52 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>
2C-PTS	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	4,00 $\pm$ 1,52 <sup>bc</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>

EE. Error estándar. a-c Diferentes letras indican diferencias entre cada una de las variables. P<0,05.

### **4.3 Potencial de aislados de nematodos entomopatógenos en diferentes dosis en invernadero**

Para obtener el potencial a nivel de invernadero, fueron seleccionados los tres tratamientos con mayor porcentaje de mortalidad en laboratorio a tres dosis distintas y un control, con ello se logró una mortalidad total del 19 %, de este el 44 % fue a causa de la dosis más alta ( $4 \times 10^5$  NEPs/  $m^2$ ), el 33 % por la dosis media y el 23 % restante de la más baja ( $2 \times 10^5$  NEPs/  $m^2$ ); pese a lo anterior no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en relación a estas dosis con la media ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad (Cuadro 8); es decir, se presentó un comportamiento similar en los nueve tratamientos a pesar de ser aislados y dosis variables. Esto puede deberse al grado de movilidad de los aislamientos tal y como lo aseguran Lezama-Gutiérrez et al. (2001) y Lalramliana y Yadav (2010) ya que encontraron que en un mismo sustrato puede haber nematodos del mismo género menos móviles que otros, aunado a ello Rodríguez et al. (2009) considera que el instar L3 es el más resistente a los NEPs y al encontrarse en potes con plántulas de caña de azúcar, estas larvas aumentan la ingesta y por ende la defecación en la que se puede restringir la infección por nematodos (Koppenhöffer y Fuzy 2004, Ansari et al. 2006). Pese a lo mencionado, se debe destacar que el tratamiento que causó mayor mortalidad fue 2C-PZ en la dosis más alta ( $32,00 \pm 8,00$  %), este aislado fue obtenido del hábitat cultivo, lo que podría justificar lo expuesto por (Mekete et al. 2005), Toepfer et al. (2010) y Hueso et al. (2015) sobre la adaptación y mayor resistencia de los aislados según la procedencia de estos. Por otra parte, se debe recalcar que los porcentajes de mortalidad resultantes en esta etapa disminuyeron incluso utilizando dosis más altas respecto a las obtenidas en laboratorio, esto puede deberse al esfuerzo en desplazamiento que deben tener los nematodos para la búsqueda del hospedero y la respectiva infección (Koppenhöffer et al. 2008, Benseddik et al. 2021), ya que en laboratorio la aplicación de los aislados fue más directa sobre las larvas y según Shapiro-Ilan et al. (2006) y Torrini et al. (2020) esto aumenta la probabilidad de contacto y por ende de infección, además de evitar un gasto elevado de energía por parte de los nematodos (Doucet et al. 2001, Mráček y Becvár 2020). Aunado a lo anterior, se debe destacar que en el caso del control la muerte fue nula, por ello hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) de este respecto a los otros

tratamientos, demostrando de esta manera que no existió otro factor en el medio que afectara la sobrevivencia de las larvas, según Grewal et al. (2004) para que exista un buen control en *Phyllophaga* debe darse una mortalidad mayor al 70 % con una dosis de  $2,5 \times 10^9$  JI/ha, siendo esta dosificación superior a la utilizada en este estudio.

Estudios realizados por Lezama-Gutiérrez et al. (2001), Stock et al. (2008) y Girón et al. (2012) utilizando nematodos del género *Steinernema* tampoco encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) de acuerdo con las dosis aplicadas y atribuyen la similitud de los porcentajes de mortalidad (24 % a 27 %) a un comportamiento característico de los aislados, refiriéndose a movilidad y capacidad de búsqueda (Ansari et al. 2006, Shapiro-Ilan et al. 2006, Stock et al. 2008); aunado a ello Grewal et al. (2004), Koppenhöffer et al. (2006) mencionan que concentraciones altas no aseguran la mortalidad del hospedero, sino la capacidad patogénica y de adaptabilidad del nematodo, ya que pese a tener una concentración alta de juveniles infectivos, estos pueden tener escasa capacidad de desplazamiento y verse afectados por factores del entorno; incluso estando en las mismas condiciones puede haber variabilidad entre los aislados siendo unos menos móviles que otros (Toepfer et al. 2010, Bal et al. 2014). Respecto a los porcentajes de mortalidad, Koppenhöffer et al. (2006) y Ruiz-Vega et al. (2020), encontraron mortalidades superiores al 52 % a nivel de invernadero, utilizando dosis de  $5 \times 10^5$  NEPs/m<sup>2</sup>, siendo dicha dosis superior a las utilizadas en este estudio; mientras Rodríguez et al. (2009) obtuvo una mortalidad del 24 % a una dosis inferior ( $625$  NEPs/larva), ya que los porcentajes de mortalidad de la dosis más baja ( $2 \times 10^5$  NEPs/m<sup>2</sup>) en los tres aislados fue de 12 % a 16 %. Aunado a lo anterior, Koppenhöffer et al. (2008) encontró mortalidades del 76 % al 100 % con aislados de *Steinernema* a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  NEPs/m<sup>2</sup>, la cual se encuentra entre el rango de las dosis aplicadas en este experimento, destacando que el porcentaje de mortalidad general no superó el 17 %. Por otra parte, Andaló et al. (2010) y Girón et al. (2012) determinaron que los porcentajes de mortalidad no aumentan a razón de las dosis aplicadas en larvas de *Phyllophaga* en condiciones de invernadero, debido a que existe un desplazamiento mayor del hospedero y por ende, el nematodo tiene una mayor dificultad de búsqueda, aunado a ello los aislados se enfrentan a diversas condiciones del medio (Shapiro-Ilan et al. 2006, Stock et al. 2008, Melo-Molina et al. 2010, Hueso et al. 2015). Según Andaló



et al. (2010), pese a evaluar tres distintas concentraciones, encontró que la ideal fue la dosis más alta de 2000 juveniles infectivos por larva en condiciones de invernadero, considerando previamente una evaluación a nivel de laboratorio para visualizar el comportamiento de los aislados.

**Cuadro 8.** Media ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp. según el tratamiento aplicado en invernadero.

<b>Código de Tratamiento</b>	<b>Dosis (NEPs/ m<sup>2</sup>)</b>	<b>Mortalidad</b>
1A-PZ	2 x 10 <sup>5</sup>	12,00 $\pm$ 8,00 <sup>a</sup>
	3 x 10 <sup>5</sup>	20,00 $\pm$ 6,32 <sup>a</sup>
	4 x 10 <sup>5</sup>	20,00 $\pm$ 6,32 <sup>a</sup>
3A-PZ	2 x 10 <sup>5</sup>	16,00 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>
	3 x 10 <sup>5</sup>	20,00 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>
	4 x 10 <sup>5</sup>	24,00 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>
2C-PZ	2 x 10 <sup>5</sup>	12,00 $\pm$ 4,90 <sup>a</sup>
	3 x 10 <sup>5</sup>	16,00 $\pm$ 7,48 <sup>a</sup>
	4 x 10 <sup>5</sup>	32,00 $\pm$ 8,00 <sup>a</sup>
Control	Agua	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>

EE. Error estándar. a Misma letra indica que no hay diferencias entre cada una de las variables. P>0,05.

Para determinar la relación del tiempo y la mortalidad en cada uno de los tratamientos, se evaluó durante 28 días sin embargo no se presentaron muertes a partir del día 15. Respecto al porcentaje de mortalidad (media  $\pm$  EE) para cada uno de los tratamientos a razón del tiempo se debe resaltar que hubo diferencias significativas ( $p=0,0029$ ) (Cuadro 9), obteniendo los valores más altos los tratamientos: 2C-PZ en la dosis más alta a las 96 horas y a los siete días (16,00 $\pm$ 2,05 %), seguido de 1A-PZ a dosis media a los siete días (12,00 $\pm$ 2,05 %), 3A-PZ en dosis alta y media con siete y 10 días respectivamente (12,00 $\pm$ 2,05 %), finalmente 3A-PZ a dosis baja al séptimo día, media al noveno día y alta a las 96 horas (8,00 $\pm$ 2,05 %). Lo anterior indica que los porcentajes de mayor mortalidad se obtuvieron en un rango de tiempo de cuatro a 10 días, siendo tratamiento 2C-PZ en dosis alta el que obtuvo la mayor mortalidad en

menor tiempo (cuatro días). Lo anterior no concuerda con lo encontrado por Rodríguez et al. (2009), Girón et al. (2015) sobre la relación de dosis-tiempo, asegurando que al aumentar la dosis se disminuye el tiempo en que se dan las muertes de las larvas, ya que dicho comportamiento solo se presentó con 2C-PZ y no con el resto de los tratamientos. Aunado a lo anterior, Koppenhöfer et al. (2008), De-Wall et al. (2011) determinaron que aislados de *Steinernema* a dosis de  $3 \times 10^8$  NEPs/ ha causan el mayor porcentaje de mortalidad (67 %) a las 48 horas después de la infección, lo cual no concuerda con lo encontrado en esta investigación, ya que la mortalidad máxima alcanzó el  $16,00 \pm 2,05$  % a los cuatro días. Por su parte, Grewal et al. (2004) determinó que la mortalidad se debe más a la capacidad de infección del nematodo y del mecanismo de defensa del hospedero (Koppenhöfer y Fuzy 2004, Ansari et al. 2006, 2008), que las concentraciones aplicadas como tal; complementando lo anterior De-Waal et al. (2011) encontró mayor mortalidad (48 %) a los dos días utilizando las concentraciones más bajas (250 y 275 juveniles infectivos por larva), asegurando que dicho comportamiento de los resultados ocurrió debido a que los nematodos aplicados en bajas concentraciones tenían más movilidad y capacidad de infección respecto a los de concentraciones altas, esto se sustenta en lo mencionado por Gómez et al. (2001) y Goodrich y Clarke (2007) sobre las diferencias que tiene cada nematodo a pesar de provenir del mismo aislado e incluso ser de la misma especie.

Diversos autores indican que han obtenido porcentajes bajos de mortalidad que van desde el 15 % hasta el 48 % en larvas de *Phyllophaga* spp. (Koppenhöfer et al. 2006, Shapiro-Ilan et al. 2006, Melo-Molina et al. 2010, Benseddik et al. 2021). Koppenhöfer y Fuzy (2004), Ansari et al. (2008) y Stock et al. (2008) atribuyen lo anterior a la relación nematodo-hospedero, en el caso del nematodo debido ya que es el encargado de buscar y liberar la bacteria dentro de la larva, y si este presenta baja capacidad de movilidad y adaptación al medio, además de dificultad para ingresar a la larva y aunado a ello la bacteria no es suficientemente virulenta da como resultado una disminución en la probabilidad de causar la muerte de la larva (Doucet et al. 2001, Mráček et al. 2005, Ansari et al. 2006, Goodrich y Clarke 2007); aunado a ello el hospedero tiende a evitar el ingreso de estos nematodos debido a su fuerte sistema inmune, además de conductas y estructuras de defensa (Mráček y Becnár 2000, Grewal et al. 2004,

Koppenhöfer y Fuzy 2004). Lo expuesto anteriormente, es complementado por Shapiro-Illan et al. (2011) respecto a los tiempos en que cada aislado provoca la muerte de jobotos, los cuales son independientes y no tienen relación a las concentraciones aplicadas, la mortalidad va a depender y va a darse en tiempos acorde con las características y capacidad que posea cada nematodo y su respectiva bacteria (Boemare 2002, Ansari et al. 2008); lo anterior podría explicar los niveles de mortalidad obtenidos de acuerdo con el tiempo en esta investigación.

**Cuadro 9.** Medias ( $\pm$  EE) del porcentaje de mortalidad causado a través del tiempo en larvas de *Phyllophaga* spp. según el tratamiento aplicado en invernadero.

Tiempo/ Tratamiento	1A-PZ			3A-PZ			2C-PZ		
	A*	B*	C*	A*	B*	C*	A*	B*	C*
24 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
48 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
72 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
96 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	8,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	16,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
120 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
144 h	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
7 días	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	12,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	8,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	12,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	16,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
8 días	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
9 días	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	8,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
10 días	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	12,00 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
11 días	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
12 días	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
13 días	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
14 días	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>

EE: Error estándar. A\* =  $2 \times 10^5$  NEPs/ m<sup>2</sup>; B\* =  $3 \times 10^5$  NEPs/ m<sup>2</sup>; C\* =  $4 \times 10^5$  NEPs/ m<sup>2</sup>. a-b Diferentes letras indican diferencias entre cada una de las variables. P < 0,05.

## 5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 10 aislados de nematodos a partir de 24 muestras obtenidas de dos hábitats distintos (aledaño, cultivo) en cuatro regiones cañeras. De estos 9 fueron del género *Steinernema* y uno de *Heterorhabditis*.
- Las variables pH y tasa de respiración, no tuvieron diferencias significativas respecto a la presencia o ausencia de nematodos entomopatógenos; sin embargo, los porcentajes altos de arena y bajos de arcilla sí se relacionaron significativamente con la presencia de estos.
- Los aislados que causaron mayor mortalidad en larvas de *Phyllophaga* spp. (L3) a nivel de laboratorio fueron tres provenientes de Pérez Zeledón (1A-PZ, 3A-PZ y 2C-PZ) con porcentajes de 32 % a 42 %, siendo el cuarto día de observación en que más muertes se cuantificaron.
- A nivel de invernadero el porcentaje de mortalidad alcanzado en larvas de *Phyllophaga* spp. (L3) se encontró entre 12 % y 32 %, en esta etapa el cuarto día fue en el que se obtuvo el valor máximo de mortalidad.

## 6. RECOMENDACIONES

- Aumentar la cantidad de muestras en las diversas regiones cañeras del país para la búsqueda de más aislados nativos y evaluar su eficiencia en plagas de importancia como el caso de *Phyllophaga* spp.
- Realizar más análisis del hábitat de las muestras como: análisis químico y materia orgánica para determinar la preferencia de los nematodos entomopatógenos de acuerdo con estos.
- Determinar la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos en larvas de primer y segundo instar (L1 y L2) de *Phyllophaga* spp.
- Evaluar los aislados de nematodos entomopatógenos a dosis más altas a nivel de invernadero para llevarlos a campo y conocer el comportamiento de estos.
- Realizar los ensayos usando el tipo de suelo de donde fueron aislados cada uno de los nematodos entomopatógenos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Acuña-Segura, R; Brenes-Madriz, J. 2020. Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga sp*). Revista Tecnología en Marcha 33:140-154. DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4376>.
- Aguilar-Rivera, N. 2011. Competitividad de la agroindustria azucarera de la huasteca México. s.l., s.e. 502 p.
- Altamirano, M. 2007. EVALUACIÓN DE INSECTICIDAS BIOLÓGICOS, BOTÁNICOS Y QUÍMICOS PARA EL CONTROL DE *Phyllophaga sp*, EN EL CULTIVO DE REPOLLO (*Brassica oleracea L*), MIRAFLORES, ESTELÍ (en línea). s.l., s.e. 11 p. Disponible en <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnq02r741.pdf>.
- Alvarado, AI. 2012. HÁBITOS PARASITARIOS Y COMPORTAMIENTO DE UN AISLAMIENTO NATIVO DEL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO *Steinernema sp*. EN LARVAS DE *Galleria mellonella L*. s.l., s.e. .
- Andaló, V; Santos, V; Moreira, GF; Moreira, CC; Junior, AM. 2010. Avaliação de nematoides entomopatogênicos em condições de laboratório e casa-de-vegetação visando ao. Ciencia Rural 40:1860-1866.
- Ángulo, KL. 2015. Entomopathogenic nematodes in biological control. Tropical Pest Management 21(2):76-92. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670878409436810>.
- Ansari, MA; Ali, F; Moens, M. 2006. Compared virulence of the Belgian isolate of *Steinernema glaseri* (Rhabditida: *Steinernematidae*) and the type population of *S. scarabaei* to white grub species (Coleoptera: *Scarabaeidae*) (en línea). Nematology 8(5):787-791. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/156854106778877938>.
- Ansari, MA; Adhikari, BN; Ali, F; Moens, M. 2008. Susceptibility of *Hoplia philanthis* (Coleoptera: *Scarabaeidae*) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*) (en línea). Biological Control 47(3):315-321. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.021>.
- Aponte, AS; Olivares, W. 2008. Capacidad de búsqueda del nematodo entomopatógeno *Steinernema sp*. SNIO 198 (Rhabditida: *Steinernematidae*) Searching capacity of the entomopathogenic nematode *Steinernema sp*. SNIO 198 (Rhabditida:

*Steinernematidae*). Revista Colombiana de Entomología 34(1):51-56.

- Arce Chaves, L; Benavides Calvo, W; Fernanda Campos Vega, M; Cascante Saborío, Y; Paul Espinoza Arceyut, J; Esquivel Rojas, P; Masís Hernández, M; Rodríguez Flores, A; Luis Zúñiga Castro, J. 2015. Caracterización del Territorio Central occidental (ALAJUELA-GRECIA-POÁS-VALVERDE VEGA). Alajuela, Costa Rica. 411 p.
- Atwa, AA. 2014. Entomopathogenic Nematodes as Biopesticides (en línea). In *Sahayaraj, K* (ed.). New Delhi, Springer India. p. 69-98 DOI: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1877-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1877-7_5).
- Badilla, F. 1995. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 37:26-33.
- Bal, H. K; Taylor, R. A; Grewal, P.S. 2014. Ambush foraging entomopathogenic nematodes employ 'Sprinters' for long-distance dispersal in the absence of hosts. The Journal of parasitology 100(4):422-432.
- Barrantes, P. 2017. Comportamiento político del Sector Cañero-azucarero en Costa Rica. Heredia, Costa Rica. 25-90 p.
- Bedding, R; Akhurst, R. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica, 21(1): 109-110.
- Benseddik, Y; Joutei, AB; Laghfiri, M; Blenzar, A; Amiri, S; Ezrari, S; Saleh, A; Mokrini, F; Tahiri, A; Dababat, AA; Lahlali, R. 2021. Efficacy assessment of entomopathogenic nematodes native to Morocco against the white grubs *Rhizotrogus obesus* Lucas and *Geotrogus olcesii* Fairmaire (Coleoptera: *Scarabaeidae*) (en línea). Crop Protection 143:105534. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105534>.
- Boemare, N. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, p. 35-56. In: Entomopathogenic nematology, Ed. R. Gaugler, Cabi Publishing, Wallingford, 388 p.
- Boff, MIC; Wieggers, GL; Gerritsen, LJM; Smits, PH. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. s.l., s.e., vol.v. 2.
- Bouyoucos, GJ. 1962. Método hidrómetro mejorado para hacer análisis de tamaño de



partículas de suelos. Revista de Agronomía. (54): 464-465. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>

- Caicedo, A. 2004. Reconocimiento de nematodos entomopatógenos asociados a *Cyrtomenus bergi* en tres localidades de Colombia. *Nematology*(2):31-42.
- Calvo, J; Vargas, J; Araya, M. 2016. Control químico de *Phyllophaga* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). X Congreso ATALAC 2016 (October).
- Campos, R; Escuer, M; Labrador, S; Robertson, L; Barrios, L; Gutiérrez, C. 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *Journal of invertebrate pathology* 95 (2):125-139.
- Chaves, M. 2006. PRODUCCIÓN DE AZÚCAR EN COSTA RICA. s.l., s.e., vol.2. p. 54-57.
- Chaves, M. 2016. Antecedentes de la producción azucarera en Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Chaves, M; Bermúdez, L. 2015. Agroindustria azucarera costarricense: un modelo organizacional y productivo efectivo con 75 años de vigencia Introducción. Departamento de investigación y extensión de la caña de azúcar (DIECA) (506):159-169.
- Chaves, M; Chavarría, E. 2012. ¿Cómo se distribuye y dónde se cultiva territorialmente la caña destinada a la fabricación de Azúcar en Costa Rica? *DIECA* 2:1-53.
- Chaves, MA; Bermúdez, AZ. (2012). Dinámica de cultivo comercial de las variedades de caña de azúcar en Costa Rica : análisis histórico. San José, Costa Rica.
- Cock, JH. 2003. Sugarcane growth and development. *International Sugar Journal* 105(1259):540-552.
- CONADESUCA. 2015. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR ( *Saccharum Officinarum* L .) Publicación Enero 2015. Ficha Técnica (México):19.
- Cueva, M. 2014. Identificación taxonómica de las especies de *Phyllophaga* (Col. Scarabaeidae) presentes en diez cultivos de importancia económica en la provincia de los ríos. s.l., s.e. 19-26 p.

- De Nardo, EAB; Grewal, PS; McCartney, D; Stinner, BR. 2006. Non-target effects of entomopathogenic nematodes on soil microbial community and nutrient cycling processes: A microcosm study. *Applied Soil Ecology* 34(2-3):250-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.01.004>.
- De Sabino, PH; Moino, A; Andaló, V; Lima, LMZ; Sales, FS. 2015. A method for measuring the concentration of CO<sub>2</sub> released by entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología* 41(2):280-282.
- Díaz, L; Portocarrero, E. 2002. Manual de Producción de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (en línea). s.l., s.e. 148 p. Disponible en [http://teca.fao.org/sites/default/files/technology\\_files/T1639.pdf](http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/T1639.pdf).
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Divya, K; Sankar, M. 2009. Entomopathogenic nematodes in pest management. *Indian Journal of Science and Technology* 2(7). DOI: <https://doi.org/10.17485/ijst/2009/v2i7/29499>.
- Doucet, M; Miranda, M; Bertolotti, M. 2001. Consideraciones acerca de nematodos entomófagos (Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Nematropica*(26):129-133.
- El-Borai, FE; Stuart, RJ; Campos-Herrera, R; Pathak, E; Duncan, LW. 2012. Entomopathogenic nematodes, root weevil larvae, and dynamic interactions among soil texture, plant growth, herbivory, and predation (en línea). *Journal of Invertebrate Pathology* 109(1):134-142. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.10.012>.
- Ferrer, F; Arias, M; Trelles, A; Palencia, G; Navarro, JM; Colmenarez, R. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* (72):39-43.
- Flores, J. 2017. Agrocadena de la Caña De Azúcar (en línea). MAG :1-80. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-10273.pdf>.
- Fogliata, FA. 1995. Agronomía de la caña de azúcar: tecnología, costos, producción (en línea). s.l., Ediciones El Graduado, (Agronomía de la caña de azúcar: tecnología, costos,

producción). 1451 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=EwFjAAAAMAAJ>.

- Girón, S; Ruiz-Vega J., Prez-Pacheco R., S-GJA and A-BT. 2012. Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca , Mexico. *African Journal of Biotechnology* 11(99):16525-16531. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB12.448>.
- Girón, S; Ruiz-Vega, J; Pérez-Pacheco, R; Ortiz Hernández, Y; Aquino-Bolaños, T. 2015. Biological Control of *Phyllophaga vetula* (Horn), and Lethal Concentrations and Times of Entomopathogenic Nematodes. *Southwestern Entomologist* 40. DOI: <https://doi.org/10.3958/059.040.0205>.
- Gómez, L; Soler, D.M; Sánchez, L. 2001. Virulencia y potencial reproductivo de aislamientos cubanos de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* (16):50-54.
- Goodrick, H; Clarke, D.J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology* (64):260-268.
- Grewal, PS; Power, KT; Grewal, SK; Suggars, A; Haupricht, S. 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with new strains of entomopathogenic nematodes (en línea). *Biological Control* 30(1):73-82. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2003.09.016>.
- Griffin, C. T; Moore, J. F; Downes, M. J. 1999. Occurrence of insect parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland. *Nematologica* (37): 92–100.
- Hara, A.H; Gugler, H; Kaya, H.K; Lebeck, L.M. 2002. Natural Populations of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) from the Hawaiian Islands. *Environmental Entomology* (17): 211-216.
- Hazir, S; Kaya, HK; Stock, P; Nevin, K. 2004. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology* 27(4):181-202.
- Hueso, E; Fallad, J; Mancilla, O; Sepulveda, J. 2015. Búsqueda de Nematodos entomopatógenos Heterorhabditidae ) en cultivos agrícolas. *Revista de Ciencias*

Ambientales y Recursos Naturales 1(1):68-74.

- Jaramillo, CM; Sáenz, A. 2013. Control de *delia platura* (diptera: anthomyiidae) en un cultivo comercial de espinaca con *steinernema* sp. cepa jcl027 (rhabditida: steinernematidae). *Nematropica* 43(1):97-104.
- Khatri-Chhetri, HB; Waeyenberge, L; Manandhar, HK; Moens, M. 2010. Natural occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in Nepal (en línea). *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1):74-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.10.007>.
- Kaya, H.K; Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. *Manual of Techniques in Insect Patology*. Academic. Lacey Ed. pp.281-234.
- Kikuta, S; Kiuchi, T; Aoki, F; Nagata, M. 2008. Development of an entomopathogenic nematode, *steinernema carpocapsae*, in cultured insect cells under axenic conditions. *Nematology* 10(6):845-851. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854108786161445>.
- King, ABS. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in central America (en línea). *Tropical Pest Management* 30(1):36-50. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670878409370850>.
- Koppenhöfer, AM; Fuzy, EM. 2004. Effect of White Grub Developmental Stage on Susceptibility to Entomopathogenic Nematodes (en línea). *Journal of Economic Entomology* 97(6):1842-1849. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/97.6.1842>.
- Koppenhöfer, AM; Grewal, PS; Fuzy, EM. 2006. Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (*Coleoptera*: *Scarabaeidae*) of economic importance in turfgrass in North America (en línea). *Biological Control* 38(3):397-404. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.013>.
- Koppenhöfer, AM; Rodriguez-Saona, CR; Polavarapu, S; Holdcraft, RJ. 2008. Entomopathogenic nematodes for control of *Phyllophaga georgiana* (*Coleoptera*: *Scarabaeidae*) in cranberries. *Biocontrol Science and Technology* 18(1):21-31. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150701721705>.
- Kung, S. P. 1990. Abiotic factors affecting the persistence of two entomopathogenic

nematodes, *Steinernema carpocapsae*, and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) in the soil (Doctoral dissertation, University Microfilms International (UMI)).

LAICA. 2016. Programa de Fitosanidad: Manejo de Plagas. Informe de Resultados 2015. San José, Costa Rica.

LAICA. 2018. Programa de Fitosanidad: Manejo de Plagas. Informe de Resultados 2017. San José, Costa Rica.

LAICA. 2020. Programa de Fitosanidad: Manejo de Plagas. Informe de Resultados 2019. San José, Costa Rica.

LAICA - La Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar. 2021. Productores (en línea, sitio web). Consultado 15 abr. 2021. Disponible en <https://laica.cr/productores/>.

Lalramliana, A; Yadav, K. 2010. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three entomopathogenic nematodes against larvae of cabbage butterfly, *Pieris brassicae* *Linnaeus* (Lepidoptera: *Pieridae*). *Science Vision* 9 (4): 166- 173.

Lezama-Gutiérrez, R; Hamm, JJ; Molina-Ochoa, J; López-Edwards, M; Pescador-Rubio, A; González-Ramírez, M; Styer, EL. 2001. Occurrence of Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: *Noctuidae*) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas (en línea). *The Florida Entomologist* 84(1):23-30. Consultado 11 jul. 2022. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/3496658>.

Loera-Gallardo, J; Pérez-Dominguez, J.; Rodríguez-Del-Bosque, L. 2015. Control Químico (en línea, sitio web). Disponible en [http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio\\_sin\\_paredes/fac\\_agri/2015/plag\\_su/cap/11.pdf](http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio_sin_paredes/fac_agri/2015/plag_su/cap/11.pdf).

Lopez, F. 2015. LA CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*) PARA LA PRODUCCIÓN DE PANELA. CASO: NORDESTE DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA. s.l., s.e. 1-239 p.

Madrigal, A. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.453 p.

- MAG. 2015. Situación de las regiones cañeras en Costa Rica (en línea). San José, Costa Rica. p. 178. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/tec-cana.pdf>.
- McClure, G; Dodson, R; Erusha, K; Ph, D. 2011. Effects of Soil Type and Soil Moisture on Infectivity and Persistence. *Turfgrass and Environmental Research Online* 10(18).
- McMullen, JG; Patricia Stock, S. 2014. In vivo and in vitro rearing of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*). *Journal of Visualized Experiments* (91):1-7. DOI: <https://doi.org/10.3791/52096>.
- Mekete, T; Gaugler, R; Nguyen, KB; Mandefro, W; Tessera, M. 2005. Biogeography of entomopathogenic nematodes in Ethiopia. *Nematropica* 35(1):31-36.
- Melo-Molina, EL; Ortega-Ojeda, CA; Gaigl, A. 2007. Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: *Melolonthidae*). *Revista Colombiana de Entomología* 33(1):21-26.
- Melo-Molina, E; Ortega, C; Gaig, A; Bellotti, A. 2010. Evaluación de nematodos entomopatógenos para el manejo de *Phyllophaga bicolor* (Coleoptera: *Melolonthidae*). *Revista Colombiana de Entomología* 36(2):207-212.
- Mráček, Z; Becvár, S. 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. *Nematology* (2):297-301.
- Mráček, Z; Becvár, S; Kindlman, P; Jersáková, J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biology Control* (34): 27-37.
- Miret, JAJ; Avilla, J. 2005. El control biológico de plagas y enfermedades (en línea). s.l., Universitat Jaume I. Servei de Comunicació i Publicacions, (Col·lecció Medi ambient). 222 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=4hZ0loEeCPUC>.
- Moron, M-A; Solis, A. 1994. El genero *Phyllophaga* en Costa Rica, Primeros registros de los subgeneros *Chirodines* Bates y *Listrochelus* Blanchard (Coleoptera: *Melolonthidae*). *Giornale Italiano di Entomologia* 7(38):181-185.
- Navarro, P. D., McMullen, J. G. & S. P. Stock. 2014. Effect of dinotefuran, indoxacarb, and imidacloprid on survival and fitness of two Arizona-native entomopathogenic nematodes

against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: *Noctuidae*). *Nematropica* 44(1): 64-73.

- Osorio, G. 2007. Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura en la Producción de Caña y Panela - Manual técnico. (en línea). s.l., s.e. 202 p. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-a1525s.pdf>.
- Palomo, A; García, F. 2000. Compatibilidad de los Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) con el Oxamilo Compatibility of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) with the oxamyl. *Bol. San. Veg. Plagas* 26:377-387.
- Perrera, AA. 2012. Efectividad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: *Heterorhabditidae*) para el control de larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: *Scarabaeidae*). s.l., s.e. 20 p.
- Reyes, MY. 2009. Conductas de agregación en estadios adultos del nématodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*. s.l., s.e. 98 p.
- Rodríguez, D; Tores, M; Uribe, L; Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 33(2):171-182.
- Rodríguez, MG; Hernández-Ochandía, D; Gómez, L. 2012. Entomopathogenic nematodes: historical development and challenges for their efficient use as biological control in Cuba. *Rev. Protección Veg* 27(3):137-146.
- Rojas, Z. 2018. Evaluación de la infectividad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 formulado en microcápsulas de alginato sobre larvas de la mosca chichera (*Hermetia illucens*)(Diptera: *Stratiomyidae*) en condiciones de laboratorio (en línea). s.l., s.e. 65 p. Disponible en <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/7520/1/44065.pdf>.
- Rosa, JS; Bonifassi, E; Amaral, J; Lacey, LA; Simões, N; Laumond, C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernema*, *Heterorhabditis*) in the azores. *Journal of Nematology* 32(2):215-222.
- Ruiz-Vega, J; Cortés-Martínez, CI; Aquino-Bolaños, T; Matadamas-Ortíz, PT; García-Gutiérrez, C; Navarro-Antonio, J. 2020. Mortality of *Phyllophaga vetula* larvae by the

separate and combined application of *Metarhizium anisopliae*, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema glaseri*. *Journal of Nematology* 52:1-8. DOI: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-068>.

Ruiz, FS. 1995. *Cultivo de la Caña de Azúcar* (en línea). s.l., Euned. 441 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=2wpC1j2AmkAC>.

Rumbos, CI; Athanassiou, CG. 2017. The use of entomopathogenic nematodes in the control of stored-product insects. *Journal of Pest Science* 90(1):39-49. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0795-y>.

Salazar, JD; Alfaro, D. 1999. MANEJO INTEGRADO Y PERSPECTIVAS DE CONTROL DE JOBOTOS *Phyllophaga* spp ( COL : Melolonthidae ) EN EN EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZUCAR EN COSTA RICA.

Salazar, D. (2011). *Plagas de la caña de azúcar*. San José, Costa Rica. p. 12-56

Salazar, D; Saénz, C; Oviedo, R; Alfaro, D. 2018. PROGRAMA DE PLAGAS Y CONTROL BIOLÓGICO DE DIECA: JOBOTO. San José, Costa Rica.

Salazar, J; Oviedo, R; Cadet, E; Sáenz, C. (2016). *Control Biológico Y Otras Estrategias De Manejo De Plagas Implementadas En El Cultivo De La Caña De Azúcar* (en línea). San José, Costa Rica. Disponible en <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Salazar-2016-BiCo-sugarcane.pdf>.

Salazar, JD. 2010. *Situación actual de las plagas de la caña de azúcar en Costa Rica*. San José, Costa Rica. p. 1-18.

Salazar, JD; Angulo, A; Rodríguez, M. 2017. *Acciones para el manejo de las principales plagas de la caña de azúcar en la Región de Guanacaste, Costa Rica*. s.l., s.e. p. 1-7.

Salazar, JD; Cadet, E; Oviedo, R. (2015). *Control biológico de jobotos *Phyllophaga elenans* (Coleoptera: Scarabaeidae) con nematodos entomopatógenos en caña de azúcar*. San José, Costa Rica.

San-Blas, E. 2013. Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980-2010. *Biological Control* 66(2):102-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.04.002>.



- Sánchez-Saavedra, MG; Cortez-Madrigal, H; Cristobal-Acevedo, D. 2012. Infectividad de heterorhabditis indica (rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 18(3):383-394. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.08.040>.
- Sandhu, HS; Singh, MP; Gilbert, RA; Odero, DC. 2016. *Sugarcane Botany : A Brief View*. University of Florida 4:1-5.
- Shannon, PJ; Carballo, C V. 1996. *Biología y Control de Phyllophaga Spp* (en línea). s.l., CATIE, (Serie Técnica Series). 132 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=8cM4jkoaJtYC>.
- Shapiro-Ilan, DI; Gaugler, R; Tedders, WL; Brown, I; Lewis, EE. 2002. Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 34(4):343-350.
- Shapiro-Ilan, DI; Gouge, DH; Piggott, SJ; Fife, JP. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control* 38(1):124-133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.005>.
- Shapiro-Ilan, DI; Leskey, TC; Wright, SE. 2011. Virulence of Entomopathogenic Nematodes to Plum Curculio, *Conotrachelus nenuphar*: Effects of Strain, Temperature, and Soil Type. *Journal of nematology* 43(3-4):187-195.
- Stock, SP; Al Banna, L; Darwish, R; Katbeh, A. 2008. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) and their bacterial symbionts (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae) in Jordan. *Journal of invertebrate pathology* 98(2):228-234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.003>.
- Toepfer, S; Kurtz, B; Kuhlmann, U. 2010. Influence of soil on the efficacy of entomopathogenic nematodes in reducing *Diabrotica virgifera virgifera* in maize. *Journal of pest science* 83(3):257-264. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0293-6>.
- Torrini, G; Paoli, F; Mazza, G; Simoncini, S; Benvenuti, C; Strangi, A; Tarasco, E; Barzanti, GP; Bosio, G; Cutino, I; Roversi, PF; Marianelli, L. 2020. Evaluation of Indigenous

Entomopathogenic Nematodes as Potential Biocontrol Agents against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Northern Italy (en línea). *Insects* 11(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11110804>.

Vashisth, S; Chandel, YS; Sharma, PK. 2013. Entomopathogenic nematodes - A review. *Agricultural Reviews* 34(3):163. DOI: <https://doi.org/10.5958/j.0976-0741.34.3.001>.

Vidaurre, D; Rodríguez Morales, A; Uribe Lorío, L. 2020. Factores edáficos y nemátodos entomopatógenos en un agroecosistema neotropical de banano. *Revista de Biología Tropical* 68(1):276-288. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v68i1.37680>.

Wagih, ME; Musa, Y; Ala, A. 2004. Fundamental botanical and agronomical characterisation of sugarcane cultivars for clonal identification and monitoring genetic variations (en línea). *Sugar Tech* 6(3):127-140. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02942714>.

White, J; Torres, M. 2009. Entomopathogenic Nematode and Bacteria Mutualism. s.l., s.e. p. 99-117 DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420069327.ch7>.

Woodring, JL; Kaya, HK. 1988. *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas. Agricultural Experiment Station.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. Promedio de mortalidad (%) de larvas de *G. mellonella* en la prueba de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch.

Región	Hábitat	Muestra	Mortalidad
Guanacaste	Aledaño	2A	87%
Valle Central	Cultivo	3C	85%
Puntarenas	Cultivo	1C	100%
		2C	100%
		1A	100%
Sur- Pérez Zeledón	Aledaño	2A	90%
		3A	100%
	Cultivo	1C	91%
		2C	100%
		3C	89%