



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

FECHA DE PRESENTACIÓN: 2008-10-20

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

DEPARTAMENTO: Protección Vegetal

ÁREA DE TRABAJO: Control Biológico

PROYECTO: Desarrollo y aplicación de prácticas ecológicas en el manejo de plagas, para incrementar la producción sostenible de papa de los agricultores de bajos recursos en las regiones andinas de Bolivia, Ecuador y Perú

ACTIVIDAD: Evaluación de la efectividad de nematodos entomopatógenos para el control del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* Hustache), (Coleoptera: Curculionidae), San Gabriel, Carchi

UBICACIÓN: Provincia: Carchi
Cantón: Montúfar
Ciudad: San Gabriel
Lugar: Colegio Técnico Agropecuario Jorge Martínez Acosta

AUTOR: Egda. Aura Chacón

COAUTOR(ES): Ing. Patricio Gallegos DNPV
Ing. Jovanny Suquillo DNPV
Ing. Carmen Castillo DNPV

COLABORADOR(ES): Unidad Técnica INIAP-Carchi
Programa Nacional de Raíces y Tubérculos PNRT-Papa.

FECHA DE INICIO: 2008-09-01

FECHA DE TERMINACIÓN: 2009-04-30

PRESUPUESTO: \$ 6.077,631

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: 37% FONTAGRO
8% INIAP
55% Tesista

Evaluación de la efectividad de nematodos entomopatógenos para el control del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* Hustache), (Coleoptera: Curculionidae), San Gabriel, Carchi.

I. ANTECEDENTES

En la zona andina del Ecuador, el cultivo de la papa es una de las principales actividades agrícolas, así la superficie nacional cosechada en el 2007 fue de 440.030 has, y una producción de 429.119 t. (SigAgro, 2007a). En el caso de la provincia del Carchi, se reportan 8.970has cosechadas, con una producción de 108.490 t. y un rendimiento de 12.1 t/ha (SigAgro 2007b).

Uno de los principales problemas que afectan al cultivo de papa, a nivel nacional es el gusano blanco *Premnotrypes vorax*, cuyas larvas se alimentan de los tubérculos reduciendo el valor comercial de la cosecha. En el Carchi el daño ocasionado por este insecto ha inducido al agricultor a realizar de 12 a 14 aplicaciones de insecticidas. (Barrera *et al.*, 2004).

Para reducir el ataque de las larvas de *P. vorax* los insecticidas de mayor uso son carbofuran y metamidofos que pertenecen a la categoría toxicológica Ib (altamente peligrosos) de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Estos productos generan efectos negativos en el comportamiento neuroconductual y cerebral de los agricultores y sus familias. Las intoxicaciones en el Carchi por plaguicidas son la segunda causa de muerte tanto para hombres como para mujeres (Yanggen *et al.*, 2003).

Una de las posibilidades para contrarrestar los efectos negativos del control químico es el desarrollo de agentes biológicos, los cuales han empezando a asumir un papel importante en el campo de la agricultura sostenible. Los insectos pueden ser atacados por virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos entomopatógenos (NEPs). Los NEPs son considerados enemigos naturales muy promisorios en el manejo integrado de plagas (Stock, 1998).

Los NEPs están clasificados en los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Los juveniles infectivos del tercer estadio (J13) son resistentes a condiciones ambientales y están adaptados morfológica y fisiológicamente para permanecer en el ambiente por períodos prolongados sin tomar alimento (Woodring y Kaya, 1988).

En Estados Unidos y Europa se reportan casos exitosos de control biológico mediante el uso de NEPs tanto en plagas foliares, como minadores de hoja (Díptera: Agromizidae) y trips (Thysanoptera: Thripidae), así como también en plagas que se desarrollan o tiene contacto con el suelo (Georgis *et. al.*, 2006).

En la Sierra Central del Perú se encontró una cepa de NEPs del género *Heterorhabditis* parasitando larvas de *Premnotrypes suturicallus* (Coleóptera: Curculionidae), que fue altamente patogénica en condiciones de laboratorio e invernadero. Evaluada en campo, con infestaciones controladas, con seis aplicaciones de NEPs (50 infectivos juveniles por cm² cuadrado), redujo el daño de los tubérculos en 81,6%. Con infestación natural con tres

aplicaciones de NEPs a la misma concentración, el daño se disminuyó en 41%. Con una aplicación de insecticida para controlar adultos y una aplicación de NEPs para controlar larvas el daño se redujo en un 98% (Alcázar *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas sobre la prospección de NEPs en Ecuador determinaron su presencia en las principales zonas productoras de papa. De los aislamientos obtenidos se seleccionaron once con una mortalidad superior al 90% en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), y una mortalidad de hasta el 68% en larvas de quinto instar de *P. vorax* (Hernández, 2006; INIAP, 2006).

En la presente investigación se tomarán los aislamientos reportados por Hernández (2006) disponibles en la colección mantenida en el Dpto. de Protección Vegetal de la EESC.

II. JUSTIFICACIÓN

Para controlar el daño de *P. vorax* en papa, los agricultores usan plaguicidas altamente tóxicos, los cuales causan efectos adversos tanto a su salud, como también para sus familias.

Frente al control convencional del gusano blanco surge la alternativa del control biológico con la utilización de NEPs como un componente adicional dentro del manejo integrado de la plaga. Es importante tomar en cuenta que los NEPs son habitantes naturales del suelo y que tienen la capacidad de parasitar y causar la muerte a insectos.

Al momento se conoce que los nematodos fueron efectivos para larvas de *P. vorax* en laboratorio, lo que permite esperar que también sean eficientes en condiciones de campo.

La capacidad de búsqueda de los nematodos, que inclusive pueden profundizar hasta la zona de tuberización, puede constituirse en una ventaja frente a los hongos entomopatógenos como es el caso de *Beauveria* sp. que prácticamente actúan por contacto.

Además, dentro de otras opciones de control, no ha sido posible identificar variedades resistentes, y tampoco se han encontrado parasitoides o depredadores, por lo cual el empleo de nematodos es una de las pocas posibilidades que se dispone al momento.

III. OBJETIVOS

General:

- Evaluar la efectividad de NEPs para el control de larvas de *P. vorax*.

Específicos:

- Determinar el efecto de nueve aislamientos de NEPs en la mortalidad de larvas de *P. vorax* de primer instar en invernadero y campo.

- Evaluar la persistencia de NEPs en campo.

IV. HIPÓTESIS

Ho : Ninguno de los aislamientos de NEPs es efectivo para controlar larvas de gusano blanco en condiciones de campo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizarán tres ensayos:

5.1 Ensayo en invernadero

5.1.1 Materiales

Tubérculos de papa de la variedad INIAP Fripapa, aislamientos de NEPs, cámaras para la cría de *P. vorax*, larvas de primer instar de *P. vorax*, discos de cartulina, tela tul, pincel No.0, aislamientos de NEPs, agua destilada, suelo estéril, bandejas, higrotermógrafo, lupa, estereoscopio, refrigerador, termómetro, micropipeta, placas petri, pala plástica, macetas plásticas, tarrinas plásticas, recipientes plásticos y material de oficina.

5.1.2 Metodología

Características del sitio experimental

El ensayo en invernadero se desarrollará en las instalaciones del Colegio Técnico Agropecuario Jorge Martínez Acosta de ciudad de San Gabriel, cantón Montúfar provincia del Carchi.

Condiciones de temperatura y humedad relativa en el invernadero:

Temperatura promedio: 18 °C

Humedad relativa: 70%

Factores en estudio

- Efecto de nueve aislamientos de NEPs en larvas de primer estadio

Tratamientos

Nueve aislamientos de NEPs y un testigo sin NEPs.

Cuadro 1. Tratamientos a evaluar para determinar la mortalidad de larvas de primer instar de *P. vorax* en invernadero.

Tratamiento	Código	Descripción (Género)	Origen
T1	Cc 01	Heterorhabditis	Carchi
T2	Cc 03	Heterorhabditis	Carchi
T3	Cb 13	Steinernema	Carchi
T4	H 03R	Steinernema	Chimborazo
T5	Ch 07	Steinernema	Carchi
T6	Ct 13	Heterorhabditis	Cotopaxi
T7	Ch 06	Steinernema	Carchi
T8	H 01G	Steinernema	Chimborazo
T9	H 04D	Steinernema	Chimborazo
T10	Testigo		

Unidad experimental

La unidad experimental (UE) estará constituida por una maceta que contendrá 1 kg de tierra esterilizada, cinco tubérculos de papa, nematodos y 50 larvas de gusano blanco, en el orden indicado en la Figura 1.

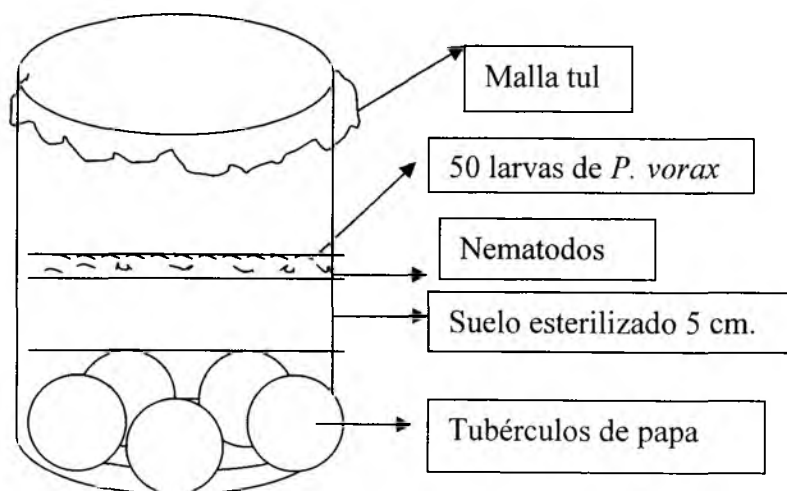


Figura 1. Esquema de la maceta que será utilizada en el ensayo en invernadero.

Diseño experimental

Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco observaciones

Análisis estadístico

Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	49
Tratamientos	9
Error experimental	36

Análisis funcional

Prueba de Tukey al 5% para tratamientos de encontrarse siguiendo factores estadísticos.

Coefficiente de variación en %.

Variables y métodos de evaluación

Daño de tubérculos. A los 40 días de la instalación de los ensayos se registrará el número de tubérculos con daño. Se determinará en los cinco tubérculos de cada unidad experimental, considerando tubérculos dañados los que presenten galerías y orificios de entrada o salida de la larva, se expresará en porcentaje.

Intensidad de daño. En tubérculos con daño se determinará su intensidad, para lo cual se seccionarán en 4 partes iguales y en cada una se estimará el área afectada por las larvas. La suma de las 4 partes dará un valor estimado de daño que se expresará en porcentaje.

Número de larvas sanas. En cada unidad experimental (tubérculos y suelo) se localizarán las larvas de *P. vorax*; larvas sanas serán aquellas que no presenten síntomas de infección con NEPs.

Número de larvas enfermas. En cada unidad experimental (tubérculos y suelo) se contarán las larvas de *P. vorax* con síntomas de infestación de NEPs.

No se incluye la variable mortalidad larval (de larvas del primer instar) debido a que es muy difícil su detección en el suelo.

Manejo específico del experimento

En el laboratorio de la Unidad Técnica INIAP – Carchi se desarrollará la cría de *P. vorax* para la provisión de huevos y larvas. Los NEPs serán multiplicados en el laboratorio de entomología del DNPV de la EESC.

Se construirá un invernadero para las pruebas de evaluación de aislamientos de NEPs.

En macetas de 30 cm de altura x 20 cm de diámetro se ubicarán cinco tubérculos de reciente cosecha de un peso entre 60 y 70 gramos; luego se colocará una capa de suelo esterilizado de aproximadamente 5 cm de grosor; sobre este suelo se aplicarán los NEPs con una rociadora manual, a continuación se liberarán las 50 larvas de *P. vorax* de primer instar. Cada maceta se cubrirá con tela tul y se mantendrá la humedad a capacidad de campo.

5.2 Ensayo en campo

5.2.1 Materiales

Tubérculos de papa de la variedad INIAP Fripapa, aislamientos de NEPs, cámaras para la cría de *P. vorax*, huevos de *P. vorax*, discos de cartulina, tela tul, pincel No.0, agua destilada, bandejas, higrotermógrafo, refrigerador, termómetro, pluviómetro, lupa, estereoscopio, micropipeta, placas petri, pala, plástico, tarinas plásticas, recipientes plásticos, vasos de precipitación y material de oficina.

5.2.2 Metodología

En campo se evaluarán nueve aislamientos de NEPs a una dosis de 100 JI3/cm² y dos testigos: uno con infestación de huevos de *P. vorax* y sin aplicación de NEPs y otro testigo sin infestación de huevos de *P. vorax* ni aplicación de NEPs. Este ensayo se implementará en Chutan Bajo en el cantón Montúfar o en Santa Martha de Cuba en el cantón Tulcán, de acuerdo a la disponibilidad de terreno.

Características climáticas

Temperatura promedio mensual máxima: 19°C.
Temperatura promedio mensual mínima: 12°C.
Humedad relativa promedio mensual: 76%
(Estación meteorológica San Gabriel, 2007).

Clasificación ecológica

Se ubica en la zona de vida bosque húmedo Montano Bajo (bhMB) (Cañadas, 1983).

Ubicación geográfica

Latitud: 77° 49' 10"
Longitud: 00° 36' 15"
Altitud: 2860 msnm

Factores en estudio

- Efecto de aislamientos de NEPs en larvas de primer instar de *P. vorax*

Tratamientos

La descripción de los tratamientos se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados para determinar la mortalidad de larvas de primer instar de *P. vorax* en campo.

Tratamiento	Código	Descripción (Género)	Origen
T1	Cc 01	Heterorhabditis	Carchi
T2	Cc 03	Heterorhabditis	Carchi
T3	Cb 13	Steinernema	Carchi
T4	H 03R	Steinernema	Chimborazo
T5	Ch 07	Steinernema	Carchi
T6	Ct 13	Heterorhabditis	Cotopaxi
T7	Ch 06	Steinernema	Carchi
T8	H 01G	Steinernema	Chimborazo
T9	H 04D	Steinernema	Chimborazo
T10	Testigo sin NEPs con infestación de <i>P. vorax</i>		
T11	Testigo absoluto		

Unidad experimental

La unidad experimental estará constituida por un sitio con cinco tubérculos

Diseño experimental

Diseño de Bloques Completos al Azar con cinco repeticiones.

Análisis estadístico

Esquema del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	54
Tratamientos	10
Repeticiones	4
Error experimental	40

CV =

Análisis funcional

Prueba Tukey al 5 % para tratamientos.

Coefficiente de variación en %.

Variables y métodos de evaluación

Número de larvas sanas. A los 40 días de la infestación con huevos de *P. vorax* y NEPs se evaluará el número de larvas sanas en la parcela neta.

Número de larvas enfermas. A los 40 días de la infestación con huevos de *P. vorax* y NEPs se evaluará el número de larvas enfermas.

Tubérculos con daño. A los 40 días de la infestación con huevos de *P. vorax* y NEPs en los tubérculos de la parcela neta se registrará el número de tubérculos con daño de gusano blanco que se expresará en porcentaje.

Intensidad de daño. Los tubérculos con daño serán seccionados en cuatro partes iguales y en cada una se estimará el área afectada por las larvas. La suma de las cuatro partes dará un valor de daño que se expresará en porcentaje.

Manejo específico del experimento

El ensayo se implementará en las localidades de Chután Bajo o Santa Martha de Cuba, de acuerdo a la disponibilidad de terreno.

La parcela constará de un surco en el que se colocaran los cinco tubérculos por sitio. La siguiente unidad experimental (o sitio) se separará con una distancia de 0.50 cm. Luego se separará con un surco libre el siguiente bloque de tratamientos. Los surcos se realizaran a una distancia de 1.2 m.

Los tubérculos serán de 60 a 70g de peso y de reciente cosecha y se cubrirán con una capa de suelo de aproximadamente 10 cm de grosor. Sobre este suelo se aplicarán los NEPs con una rociadora manual, a continuación se colocarán 20 huevos de *P. vorax* ovipositados 15 días antes.

5.3 Ensayo sobre persistencia de nematodos en el suelo

Este ensayo consistirá en infectar, en laboratorio, 40 larvas de gusano blanco con cada una de los nueve aislamientos de nematodos, en la dosis de 200 por unidad de prueba. Posteriormente estas larvas se distribuirán en campo en un área de 80x80cm y se cubrirán con una capa de cinco centímetros de suelo.

A los 30, 60 y 90 días se tomaran muestras de suelo, mediante barreno, y hasta 15cm de profundidad, las que se colocaran en recipientes de plástico de aproximadamente un kilogramo de capacidad. En estos recipientes se pondrán larvas de gusano blanco sanas o larvas de *G. mellonella*.

Las larvas procedentes de cada fecha se colocaran en trampas tipo “White” para determinar la presencia de NEPs, o mediante su disección.

5.4 Requerimientos de producción de NEPs

Se empleará el método “**in vivo**” por ser el más apropiado para la producción de JI3 para ensayos de laboratorio y en campo a pequeña escala. En este método se utiliza frecuentemente el último instar de *G. mellonella* por ser altamente susceptible a NEPs. La producción promedio de infectivos juveniles por larva de *G. mellonella* es de 30 a 50000. (Arteaga *et al.*, 1994). El cuadro 3 indica el requerimiento de nematodos para el ensayo de invernadero.

Cuadro 3. Producción de NEPs para el ensayo en invernadero

Dosis JI3/cm ²	Sup/maceta cm ²	Dosis/JI3 maceta	# aislam	# de rep.	Cant. de NEPs /aislamiento	Cant. de NEPs /ensayo	# larvas <i>G. mellonella</i> total
50	400	20.000	9	5	100.000	900.000	90

Para la prueba de campo el requerimiento de nematodos será de 27 000 IJ3 por aislamiento, para lo que se necesitarán tres larvas de *G. mellonella* por aislamiento y repetición. Este cálculo se basa en que por cada larva se obtienen 10 000 IJ3.

En la prueba de persistencia se emplearan 200 IJ3 por aislamiento. Para la prueba de campo se necesitará igual número de nemátodos y por lo tanto igual número de larvas de *G. mellonella* que en la prueba de invernadero, es decir 90 larvas.

5.4 Análisis de costos

Se realizará un análisis de costos de producción de los NEPs para una aplicación de una hectárea de cultivo de papa.

VI. CRONOGRAMA

	Meses										
Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cría de larvas de <i>P. vorax</i>	x	x									
Elaboración de propuesta			x								
Aprobación propuesta				x	x						
Instalación del ensayo en invernadero					x						
Toma de datos						x					
Análisis de datos						x	x				
Instalación del ensayo en campo							x				
Toma de datos								x			
Prueba de persistencia								x	x	x	
Toma de datos								x	x	x	
Análisis de datos			x	x	x	x	x	x	x	x	
Redacción del documento	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Presentación informe final											x

VII. Presupuesto

Rubro	Unidad	Cantidad	Valor unitario USD	Total USD
Infraestructura				
Construcción de invernadero	m ²	25	10	250,00
Material biológico				
Larvas de <i>P. vorax</i>	larvas	2500	0.01	25,00
Larvas de <i>G. mellonella</i>	larvas	468	0.02	9,36
NEPs.	IJ	1'386.000	0.00001	13,86
Tubérculos de papa	qq	3	15	45,00
Materiales de laboratorio				
Cajas petri	cajas	100	0,5	50,00
Agua destilada	litro	5	1	5,00
Pinzas	unidad	3	4	12,00
Vaso de precipitación	unidad	10	5	50,00
Ligas	kg	0.5	2.5	1.25
Bandejas plásticas	unidad	3	4	12,00
Macetas plásticas	unidad	110	5	550,00
Estantería	unidad	2	30	60,00
Tarrinas plásticas de 1 lit.	tarrinas	200	0.05	10,00
Malla tul	metros	10	4	40,00
Plástico	metros	245	0,6	40,00
Servicios				
Preparación del suelo	arada y rastra	2	15	30,00
Surcado	jornal	1	8	8,00
Estacas y grapas	varios			25,00
Mano de obra	jornal	1	8	8,00
Equipos y materiales oficina				
Aspersor manual	unidad	1	10	10,00
Papelería, marcadores y copias	varios		200	200,00
Movilización				
Alquiles de vehículo				300,00
Viáticos		12	50	600,00
Subsistencias		3	25	75,00
Tesista	mes	12	280	3.360,00
Subtotal				5.788,22
Imprevistos (5%)				289,411
Total				6.077,631

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ALCAZAR, J., KROSSCHEL, J. y KAYA, H. 2007. Evaluación del potencial de un nematodo entomopatógeno nativo *Heterorhabditis* sp. para el control del gorgojo de Los Andes *Premnotrypes suturicallus* Kuschel en campo. Lima, Perú. p. 26.
- ARTEAGA, E., FERNANDEZ, E. y VÁSQUEZ, T. 1994. Los nemátodos entomopatógenos. Situación actual y perspectivas. III Simposio Internacional de Zoología. La Habana, Cuba.
- BARRERA, V., ESCUDERO, L., NORTON, G., y ALWANG, J. 2004. Encontrando salidas para reducir los costos y la exposición a plaguicidas en los productores de papa: Experiencia de la intervención en la provincia del Carchi, Ecuador. INIAP, IPM-CRSP, CROPLIFE, FAO. Quito, Ecuador. 122 pp.
- CAÑADAS, L. 1983. El Mapa Bioclimático y Ecológico del Ecuador. MAG-PRONAREG. Quito, Ecuador.
- GEORGIS, R., KOPPENHO A.M., LACEY L.A., BELZIR G., DUNCAN L.W., GREWD P.S., SAMISH M., TAN L., TORR P. & VAN TOL R.W. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control* 38:103-123.
- HERNÁNDEZ, P. 2006. Colección, Patogenicidad y Caracterización Ecológica de Nematodos Parásitos de Insectos de gusano blanco. Quito, Ecuador. Tesis de Maestría. Escuela Politécnica del Ejército.
- INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS 2006. Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal, EESC.
- SIGAGRO 2007a. <http://www.sica.gov.ec/cadenas/papa/docs/produccion/htm>
- SIGAGRO 2007b. <http://www.sica.go.ec/cadenas/papa/docs/provincias/htm>
- STOCK, P. 1998. Sistemática y Biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional del Litoral Esperanza. Argentina.
- WOODRING, J.L. y H.K. KAYA. 1988. *Steinernematis* and *Heterorhabditis* Nematodes: A Hanbook of Techniques. Southem Cooperative. Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville.
- YANGGEN, D., CRISSMAN, C. y ESPINOSA, P. 2003. Los plaguicidas: Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Centro Internacional de la Papa – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador. p.198.IX.