

Susceptibilidad de *Delia platura* (Meigen, 1826) (Diptera: Anthomyiidae) a *Steinernema* spp y *Heterorhabditis* spp.

José Joaquín Celeita Bernal

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de  
BIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
2010

Susceptibilidad de *Delia platura* (Meigen, 1826) (Diptera: Anthomyiidae) a *Steinernema* spp y  
*Heterorhabditis* spp.

José Joaquín Celeita Bernal

---

INGRID SCHULER Ph.D.

Decana Académica

Facultad de Ciencias

---

ANDREA FORERO

Directora Carrera de Biología

Facultad de Ciencias

Susceptibilidad de *Delia platura* (Meigen, 1826) (Diptera: Anthomyiidae) a *Steinernema* spp y *Heterorhabditis* spp.

José Joaquín Celeita Bernal

APROBADO

---

ADRIANA SÁENZ APONTE M.Sc.  
DIRECTOR

---

LUZ STELLA FUENTES M.Sc.  
PAR ACADÉMICO

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Adriana Sáenz Aponte y a mi evaluadora Luz Stella Fuentes, por su asesoría y apoyo.

Al laboratorio de Control Biológico de la Pontificia Universidad Javeriana, por la financiación de parte de este proyecto.

Al Padre Gerardo Remolina S.J. ex rector de la Pontificia Universidad Javeriana por su ayuda para iniciar este proceso.

A la Doctora Elizabeth Hodson de Jaramillo, a la Doctora Ingrid Schuler, al Doctor Fabio Roldan por su apoyo como ex directoras y actual director del departamento de Biología.

A los integrantes de la Unidad de Ecología y Sistemática (UNESIS) de la pontificia Universidad Javeriana, por su gran colaboración y apoyo durante todo este proceso.

A mi familia en especial a mis padres por su gran apoyo moral y afectivo.

A mis amigos por el ánimo

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 Ciclo de vida de <i>Delia platura</i> (Meigen, 1826).....	4
3.2 Nematodos entomopatógenos (NE).....	5
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 Objetivo general.....	8
4.1 Objetivos específicos .....	8
5. METODOLOGÍA .....	8
5.1 Cría de <i>Delia platura</i> .....	9
5.2 Obtención de nematodos entomopatógenos usados.....	9
5.3 Prueba de patogenicidad .....	10
5.4 Dosis de nematodos entomopatógenos .....	10
5.5 Diseño experimental y análisis estadístico.....	11
6. RESULTADOS .....	11
6.1 Patogenicidad.....	11
6.2 Dosis .....	14
7. DISCUSIÓN.....	16
8. CONCLUSIONES .....	18
9. RECOMENDACIONES .....	18
10. BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXOS	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colecta y cría de <i>Delia platura</i> .....	9
Figura 2. Bioensayo nematodos entomoptógenos vs. larvas de <i>Delia platura</i> .....	11
Figura 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de <i>Delia platura</i> expuestas a cuatro especies de nematodos entomopatógenos. ....	12
Figura 4. Tiempo de mortalidad de larvas de tercer instar de <i>Delia platura</i> expuestas a cuatro especies de nematodos entomopatógenos.....	12
Figura 5. Signos presentes en larvas de <i>Delia platura</i> infectadas por nematodos entomopatógenos .....	13
Figura 6. Larvas de tercer instar de <i>Delia platura</i> evitando el contacto con los NE a) larva en la tapa de la unidad experimental b) larva en la pared de la unidad experimental.....	14
Figura 7. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de <i>Delia platura</i> expuestas a cinco dosis del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> .....	15
Figura 8. Tiempo de mortalidad de larvas de tercer instar de <i>Delia platura</i> expuestas a cinco dosis de JI de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> .....	15

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Características ambientales y procedencia de los nematodos entomopatógenos utilizados.....	10
--	----



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NE	Nematodos entomopatógenos
JI	Juveniles Infeccivos
mm	milímetros
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
L	Litros
DCA	Diseño completamente al azar
DDI	Días después de la infección
HDI	Horas después de la infección
fl.Oz	Onza liquida.

## RESUMEN

La mosca *Delia platura* esta reportada como una plaga limitante en la producción de diferentes hortalizas, particularmente en los cultivos de espinaca *Spinacia oleracea* L., 1753 del municipio de Cota; el daño que causa en el estado larval consiste en la destrucción del tallo, raíz de la plántula y del punto de crecimiento de la planta cuando esta próxima a la cosecha, por tal razón los agricultores utilizan indiscriminadamente la aplicación de plaguicidas para contrarrestar el daño mencionado, como consecuencia de este método de control, se genera problemas en la salud de los productores, consumidores, efecto negativo sobre el ambiente y altos costos de producción.

Para reducir este impacto, en este trabajo se prueba la susceptibilidad de las larvas de tercer instar de *Delia platura* a juveniles infectivos (JI) de 4 especies de nematodos entomopatógenos (NE) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* en condiciones de laboratorio, como alternativa biológica en el control de la plaga, para lo cual se hizo una cría de las larvas de *Delia platura* en tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*). *Heterorhabditis bacteriophora* en una dosis de 7500 JI/larva fue la que causo el mayor porcentaje de mortalidad con 62,25% del total de las larvas expuestas a dicho tratamiento.

**PALABRAS CLAVE:** Control Biológico, *Delia platura*., Nematodos entomopatógenos, Mortalidad.

## 1. INTRODUCCIÓN

La interacción de los insectos y sus enemigos naturales es un proceso ecológico esencial porque regula las poblaciones de insectos evitando que se conviertan en potenciales plagas (Dent 2000). Estos procesos ecológicos se ven interrumpidos por el establecimiento de monocultivos y el uso de insecticidas para su mantenimiento, dado que estos no solo afectan los insectos plaga sino también los enemigos naturales, permitiendo que las poblaciones de fitófagos se incrementen y se conviertan en plagas (Dent 2000).

Como ejemplo de estas plagas, están las moscas del género *Delia* (Anthomyiidae) las cuales son de hábito fitófago en su etapa larval, por lo que pueden convertir en plagas de muchos cultivos tales como cebolla (*Allium fistulosum* L.), atacado por *Delia antiqua*, semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), atacada por *Delia platura*, el nabo (*Brassica rapa* L.) por *Delia floralis* y la col (*Brassica olearacea*) atacada por *Delia radicum* (Hennig 1976; Griffiths 1990 en Gouinguene & Stadler 2005). En general, el daño se observa en las raíces de plántulas y semillas en germinación debido a que estas moscas ovipositan en el suelo y en este se desarrollan sus larvas (Gouinguene y Stadler 2005).

Dado el daño y manejo de esta plaga, se ha buscado restaurar este proceso natural tratando de introducir enemigos naturales a los sistemas agrícolas y recuperar el equilibrio de las poblaciones de insectos; siendo el principal objetivo de Control Biológico al utilizar insectos depredadores, parasitoides, entomopatógenos (hongos, bacterias y nematodos) para controlar las poblaciones de insectos (Dent 2000). El control Biológico puede ser una estrategia eficaz para el manejo de plagas con hábitos crípticos, ya que los enemigos naturales pueden buscarlas activamente en los lugares donde estas se ocultan (Rodríguez *et al.* 2006).

Teniendo en cuenta lo anterior en el presente trabajo se planteó evaluar la susceptibilidad de larvas de tercer instar de *Delia platura* a NE de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* en condiciones de laboratorio, cuantificando la mortalidad de larvas de *Delia platura* expuestas a los aislamientos *Heterorhabditis* sp. (SL0708), *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema*

*colombiense* y *Steinernema websteri* y comparar su susceptibilidad y capacidad de los nematodos para reproducirse en *Delia platura*.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

*Delia platura* conocida como gusano de la semilla del maíz, se ha reportado como plaga de cultivos de remolacha (*Beta vulgaris*), alcachofa (*Cynara scolymus*), col de Bruselas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), repollo (*Brassica oleracea* var. *viridis*), melón (*Cucumis melo*), zanahoria (*Daucus carota*), coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), maíz (*Zea mays*), pepino (*Cucumis sativus*), ajo (*Allium sativum*), lechuga rizada (*Lactuca sativa*), habas (*Vicia faba*), mostaza (*Sinapis*), cebolla (*Allium cepa*), arveja (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita*), nabo (*Brassica rapa*), habichuela (*Judaphaseolus vulgaris*), espinacas (*Spinacia oleracea*), papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Solanum lycopers*) (Capinera 2001).

En Colombia, en el municipio de Cota, en los cultivos de espinaca *Spinacia oleracea* L., los daños producidos por la larva de *Delia platura* consisten en la destrucción del tallo y la raíz de la plántula y del punto de crecimiento de la planta cuando esta próxima a la cosecha; por tal razón, los productores pueden realizar hasta 6 aplicaciones de plaguicidas en un ciclo de cultivo de tan solo 60 días (Gil *et al.* 2007). La mayoría de los plaguicidas utilizados son de alto espectro como los organofosforados, organosulfurados y piretroides por lo que eliminan indiscriminadamente insectos plaga y benéficos; además, el uso inapropiado y frecuente de estos productos genera problemas en la salud de los productores, consumidores, daños ambientales y altos costos de producción (Gil *et al.* 2007).

La importancia de la agricultura ecológica y la búsqueda de alternativas para la reducción de los impactos producidos por el uso indiscriminado de los plaguicidas, resalta la implementación del control biológico, ya que utiliza entre otras alternativas los NE para el control de insectos plaga (Chen *et al.* 2003). Las especies de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae tienen atributos de patógenos por tener quimiorreceptores que les facilita la búsqueda del huésped (Kaya & Gaugler, 1993 en Lacey *et al.* 2001), estar asociados con bacterias mutualistas de los géneros

*Xenorhabdus* (Steinernematidae) y *Photorhabdus* (Heterorhabditidae), siendo este complejo altamente virulento y matando a su huésped en aproximadamente 48 horas (Lacey *et al.* 2001).

Al aplicar NE para el control de plagas cuya etapa larval se desarrollan en el suelo, se puede lograr un control efectivo de estas, debido a que el suelo es el hábitat natural de los NE y esto maximiza su efectividad en el control de estas plagas (Georgis y Manweiler 1994; Koppenhofer 2000 en (Lacey *et al.* 2001). Los NE a diferencia de otros controladores biológicos se reproducen masivamente, porque de un solo hospedero pueden emerger miles de JI y persistir por largo tiempo en el suelo controlando de una forma continua las plagas (Fenton *et al.* 2001).

Otra ventaja de la utilización de los NE en el control de plagas, es que pueden ser aplicados mediante los mismos sistemas utilizados para plaguicidas, por lo que no se generan costos extras por los sistemas de aplicación a utilizar (Shapiro-Ilan, *et al.* 2005). El uso de los NE contribuye a la disminución de plaguicidas y a la reducción de la contaminación generada sobre el ambiente, productores y consumidores por las trazas en los alimentos que se producen bajo esta modalidad de agricultura (Chen, *et al.* 2003).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Ciclo de vida de *Delia Platura***

El ciclo completo de *Delia platura* puede durar de 15 a 77 días, normalmente en el trópico dura alrededor de 22 días, el ciclo es más largo en zonas templadas porque la larva crece en verano y la pupa entra en diapausa en invierno, el número de generaciones por año es incierto, esto depende de la diapausa que presente la población y de variables ambientales (Capinera 2001). Los huevos son elongados y ovoides de color perla blanco, miden aproximadamente 0.99mm, teniendo un rango entre los 0.90-0.95mm de largo y 0.30mm de ancho, por lo general los huevos son puestos por el adulto en la superficie del suelo individualmente o máximo en grupos de 10, la ovoposición se da a temperaturas entre los 10-27 °C, los sitios favoritos de ovoposición son semillas en germinación o en descomposición, material vegetal en descomposición y fertilizantes orgánicos; el periodo de tiempo en el estado huevo depende de la temperatura entre 15-28 °C es

de 2 a 3 días, mientras que a temperaturas de 5-7 °C la eclosión puede darse entre los 7 a 9 días (Capinera 2001).

La larva es blanca y presenta tres instar, inicialmente mide 0.7mm y 7mm la larva madura, estas larvas se alimentan de forma gregaria, el primer instar no ataca efectivamente las plantas sanas, afecta las recién cortadas o con heridas, por ejemplo cortes de semillas de papa. Estas larvas se alimentan y desarrollan mejor si la comida está en proceso de descomposición, la rapidez del crecimiento de la larva depende de la temperatura, la óptima está entre los 21-30 °C, en estas condiciones el primer instar dura 1-3 días, el segundo 3-5 días y el tercer instar de 5-16 días (Capinera 2001).

La pupa es ovalada y rojiza, antes de emerger el adulto la pupa se torna café oscuro, esta puede medir de 4-5mm de largo y 1.5mm de ancho, la larva en prepupa baja al suelo y pasa al estado de pupa, esto ocurre a menudo en el lugar de alimentación, también puede ocurrir que cuando las larvas se entierran en el sustrato del cual se están alimentando, pueden pupar en este, como ejemplo larvas que se alimenten en las semillas de papa; el periodo de pupa dura aproximadamente de 7-14 días a una temperatura de 18-24 °C (Capinera 2001). Los adultos son de color pardo grisáceo, el macho tiende a tener rallas en el tórax y una en la mitad del dorso. Las hembras carecen de rallas, las patas son de color negro, las alas no tienen marcas, pero si una venación oscura, estos adultos pueden medir entre 4-5 mm de longitud (Capinera 2001).

### **3.2 Nematodos entomopatógenos**

Los NE son efectivos controlando insectos plaga del suelo debido a que este también es su hábitat natural (Georgis y Manweiler 1994; Koppenhofer 2000 en Lacey *et al.* 2001). Teniendo en cuenta esto se consideran los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* de alto potencial en el control de insectos plaga en la horticultura (Simons 1981; Kakouli-Duarte *et al.* 1997 en Chen *et al.* 2003).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son buenos controladores del gorgojo de la raíz de los cítricos (*D. abbreviatus*), el gorgojo negro de la vid (*Otiorhynchus sulcatus*), el gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*) en viveros y arandanos ( Lacey *et al.* 2001). Algunas especies de

nematodos son más efectivas contra un insecto o grupo de insectos en particular que contra otro, por ejemplo *Steinernema kushidai* es eficaz contra larvas de escarabajos (Coleópteros) y no muy efectivos contra larvas de mariposas y polillas (Lepidópteros) (Mamiya 1989 en Lacey *et al.* 2001), por su parte *Steinernema scapterisci* es buen controlador de grillos topo (Ortópteros), pero no es eficaz contra otros grupos de insectos (Nguyen y Smart 1991 en Lacey *et al.* 2001).

Los NE se encuentran generalmente hasta los 5cm del suelo, los JI infectan larvas de vida libre y hábitats crípticos; la infección se da a través de espacios intersegmentales y entradas naturales, como el ano, espiráculos y boca (Fenton, *et al.* 2001). Ya dentro del insecto los NE liberan bacterias asociadas de los géneros *Xenorhabdus* o *Photorhabdus* dependiendo del genero de NE, estas bacterias se reproducen y digieren la hemolinfa del insecto parasitado causándole la muerte en aproximadamente 48 horas proporcionando, el alimento para los NE (Fenton *et al.* 2001). Los NE permanecen dentro del insecto por tres o cuatro generaciones, esto depende del tamaño del huésped, luego los JI salen del hospedero y regresan a su ambiente natural para infectar un nuevo huésped (Fenton *et al.* 2001). Teniendo en cuenta esto se consideran los NE de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* de alto potencial en el control de insectos plaga en la horticultura (Simons 1981; Kakouli-Duarte *et al.* 1997 en Chen, *et al.* 2003).

El comportamiento de forrajeo de los NE puede afectar su eficacia si no se tiene en cuenta el comportamiento de la plaga a controlar, ya que algunas especies de NE son emboscadores por lo que se mantienen inmóviles en espera de que su huésped pase cerca para adherirse e infectarlo, ejemplo de esto son *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema scapterisci* (Campbell y Gaugler 1993; Lewis *et al.* 1993 en Lacey *et al.* 2001). Otras especies como *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora* son cruceros por lo que se mantienen en constante búsqueda de su huésped por lo que son más efectivos para el control de insectos con poca movilidad en el suelo (Lacey *et al.* 2001). Pero factores como la humedad del suelo y la textura del mismo pueden influir en la movilidad de los JI, si la humedad es baja o por el contrario muy alta los JI no se pueden desplazar fácilmente (Koppenhofer *et al.* 1995. en Koppenhofer y Fuzy 2006).

También se debe tener en cuenta que la eficacia de los NE depende de la especie y cantidad (dosis) de JI aplicada, así como del estado de desarrollo de la plaga (Nielsen 2003). El hospedero también puede disminuir la eficacia de los NE ya que ha desarrollado estrategias como el acicalamiento de su cuerpo y la evasión para evitar ser infectados, como ejemplo de esto es el escarabajo japonés *Popillia japonica*, roza su cuerpo contra los sustratos u objetos para limpiarse los NE (Gaugler *et al.* 1994. en Ennis *et al.* 2010). Esto conlleva a un desgaste energético por parte del hospedero, este incluso reduce su alimentación para evitar ser infectado, otros estudios con gorgojos del pino *Hylobius abietis* muestran, que este es más propenso a responder a las cepas de NE más virulentas que a las menos virulentas (Girling *et al.* 2010. en Ennis *et al.* 2010), además de esto la mayoría de los dípteros entre ellos los del género *Delia* tienen sus aberturas naturales muy reducidas y una cabeza que se retrae en el protórax, lo que puede disminuir la posibilidad de rutas de infección por parte de los NE (Coaker y Finch 1971 en Willmott *et al.* 2002).

Entre las especies de la familia Anthomyiidae, el gusano de la col (*Delia radicum*) es en el que más se han realizado estudios para ser controlado con NE, el nivel de control obtenido con los NE ha sido variable y no muy confiable desde el punto de vista comercial en contraste con la efectividad de los plaguicidas (Bélaïr *et al.* 2005). Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae en dosis altas garantizan el contacto de los NE con el huésped, por ejemplo en una dosis de 4000 JI por planta se controló entre un 40% y 50% de las larvas de tercer instar de *Delia radicum*, reduciendo significativamente la cantidad de insectos luego de las aplicaciones (Chen *et al.* 2003). Por otra parte la temperatura adecuada para que los NE sean más efectivos en el control del último estadio larval de *Delia radicum* está entre los 15°C y 20°C (Chen *et al.* 2003).

Otros estudios sobre la susceptibilidad de *Delia radicum* a NE muestran que en campo se necesitan dosis muy altas de hasta 64000 JI por planta para obtener un control económicamente efectivo (Simser 1992; Vanninen *et al.* 1999 en Willmott *et al.* 2002). Un ejemplo de esto es el trabajo de Welch y Briand (1961) quienes utilizaron dosis de 45000 JI de *Steinernema carpocapsae* por planta, por su parte otros trabajos con especies de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* en dosis de 30000 JI por planta no obtuvieron ningún control sobre *Delia radicum*



probablemente debido al uso de cepas no óptimas y factores ambientales que pueden dificultar la infección del hospedero (Steiner 1996 en Willmott *et al.* 2002). También se han encontrado mortalidades de 70% en experimentos realizados sobre larvas de tercer instar de *Delia radicum* utilizando el NE *Steinernema feltiae* mientras que con otras especies del mismo género de NE se observó una mortalidad del 40 al 60%, utilizando entre 50 y 250 JI por larva a una temperatura de 18-20°C (Nielsen 2003).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la susceptibilidad de *Delia platura* en el estado de larva expuesta a cuatro especies de nematodos entomopatógenos de *Steinernema* y *Heterorhabditis* bajo condiciones de laboratorio.

### **4.2 Objetivos específicos**

- \* Evaluar la mortalidad de larvas de *Delia platura* expuestas a cuatro aislamientos de *Steinernema* sp y *Heterorhabditis* sp
  
- \* Comparar la susceptibilidad de *Delia platura* en larvas de tercer instar frente al mejor aislamiento de nematodos entomopatógenos.
  
- \* Confirmar la capacidad de los nematodos para reproducirse en *Delia platura*

## **5. METODOLOGÍA**

El experimento se realizó en el laboratorio de Control Biológico de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

### 5.1 Cría de *Delia platura*

Se colectaron adultos de *Delia platura* en cultivos de espinaca de 15 días de edad en la Finca Sede Roso, vereda Roso, en el municipio de Cota Cundinamarca, con el fin de iniciar una cría para la obtención de larvas. Para esto, se utilizaron 20 botellas de plástico de 1.5 L de capacidad, con masato de arroz en fermento ( $3\text{cm}^3/\text{botella}$ ) como atrayente, se colocaron 5 botellas por surco cada 15 metros y dejando 5 surcos entre cada línea de botellas (Fig. 1 a). Los adultos capturados se expusieron a tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*) cortados a la mitad, colocando la parte expuesta por el corte hacia abajo sobre cuadros de icopor de  $1\text{cm}^3$  ubicados en bandejas medianas plásticas en cuya base se ubico arena estéril, el montaje se dejó por 8 días para que las hembras ovipositaran y se desarrollaran las larvas. La cría se mantuvo a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa de  $75 \pm 2\%$ , 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Fig. 1 b), como lo recomienda Jiménez *et al.* (2010).



a



b

**Figura 1.** Obtención de *Delia platura* a) Trampas para colecta de adultos y b) cría de larvas.

### 5.2 Obtención de nematodos entomopatógenos.

El NE *Heterorhabditis* sp. (SL0708) fue suministrado por el laboratorio de Control Biológico de la Pontificia Universidad Javeriana y los NE *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema colombiense* y *Steinernema websteri* fueron suministrados por el acuerdo de Cenicafe No 182; las especies aisladas son procedentes de diferentes lugares y condiciones ambientales (Tabla 1). Los NE se encontraban almacenados en espumas de poliuretano. Los JI se extrajeron, humedeciendo la espuma en agua destilada y exprimiéndola en un vaso de precipitado para la obtención de las diferentes dosis a utilizar en los ensayos.

**Tabla 1.** Características ambientales de la procedencia de los nematodos entomopatógenos.

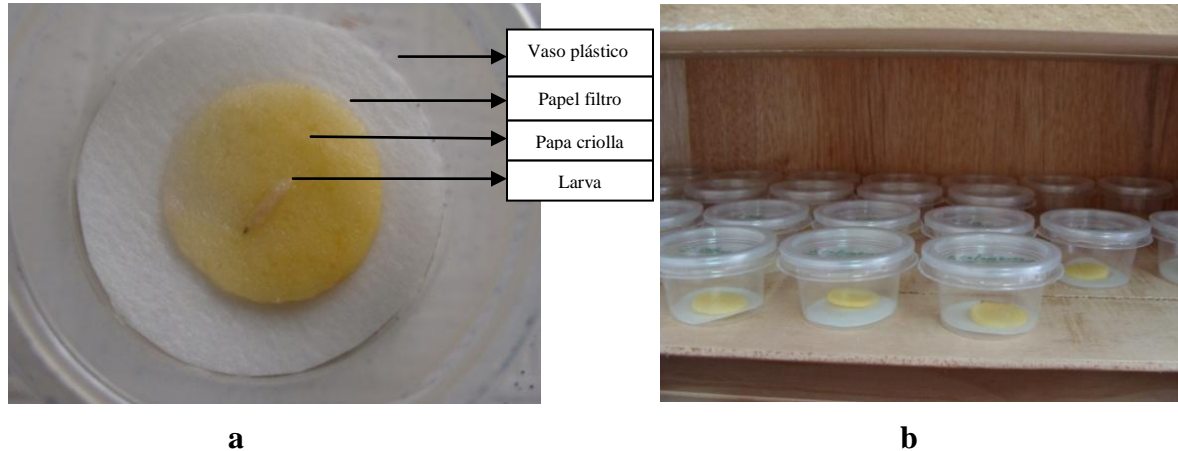
Género	Especie	Cepa	Estación/Municipio/Dept	Altura (m)	Tipo de suelo	pH	Vegetación
<i>Steinernema</i>	<i>websteri</i>	JCL006	Naranjal/Chinchiná/Caldas	1381	Unid Chinchina (Melanudans) Cenizas volcánicas	3,9-5,2	Bosque
<i>Steinernema</i>	<i>colombiense</i>	SNI0198	Maracay/Quimbaya/Quindío	1402	Unid Chinchina y Montenegro (Melanudans) Cenizas volcánicas	4,9	Café libre exposición
<i>Heterorhabditis</i>	<i>bacteriophora</i>	HNI0100					
<i>Heterorhabditis</i>	sp.	SL0708	Alcalá/Valle del Cauca		Franco arenoso	4,76	Guadual

### 5.3 Prueba de patogenicidad

Se individualizaron 15 larvas de tercer instar de *Delia platura* en vasos plásticos de 1fl.Oz de capacidad, con papel filtro esterilizado y 5g de papa criolla como alimento. Se aplicó una dosis de 2500 JI/larva en cada unidad experimental (Fig. 2a). Las unidades experimentales se mantuvieron a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70% de humedad y oscuridad (Fig. 2b). Este ensayo se realizó dos veces para un total de 30 larvas por tratamiento. Se efectuaron observaciones diarias durante 8 días después de la infección (DDI) y se registró los síntomas y número de larvas muertas. Las larvas muertas se disectaron y observaron en un estereomicroscopio con el fin de corroborar la presencia de estados de desarrollo de NE.

### 5.4 Dosis de nematodos entomopatógenos

Se individualizaron 15 Larvas de tercer instar de *Delia platura* en vasos plásticos de 1fl.Oz de capacidad con papel filtro esterilizado y 5g de papa criolla como alimento (Fig. 2 a). Las dosis de 600, 1200, 2500, 5000 y 7500 JI/larva fueron evaluadas siguiendo las recomendaciones de Nielsen (2003). Las unidades experimentales se mantuvieron a la misma temperatura y humedad relativa que el primer bioensayo (Fig. 2b). Este ensayo se realizó dos veces para un total de 30 larvas por tratamiento. Se realizaron observaciones hasta los 8 días después de la infección (DDI) y se registró el número de larvas muertas. Las larvas muertas se disectaron y observaron en un estereomicroscopio con el fin de corroborar la presencia de diferentes estados de desarrollo de NE.



**Figura 2.** Bioensayo NE vs. larvas de *Delia platura* a) Unidad experimental b) Unidades experimentales en caja de madera para mantener las condiciones ambientales requeridas por los NE.

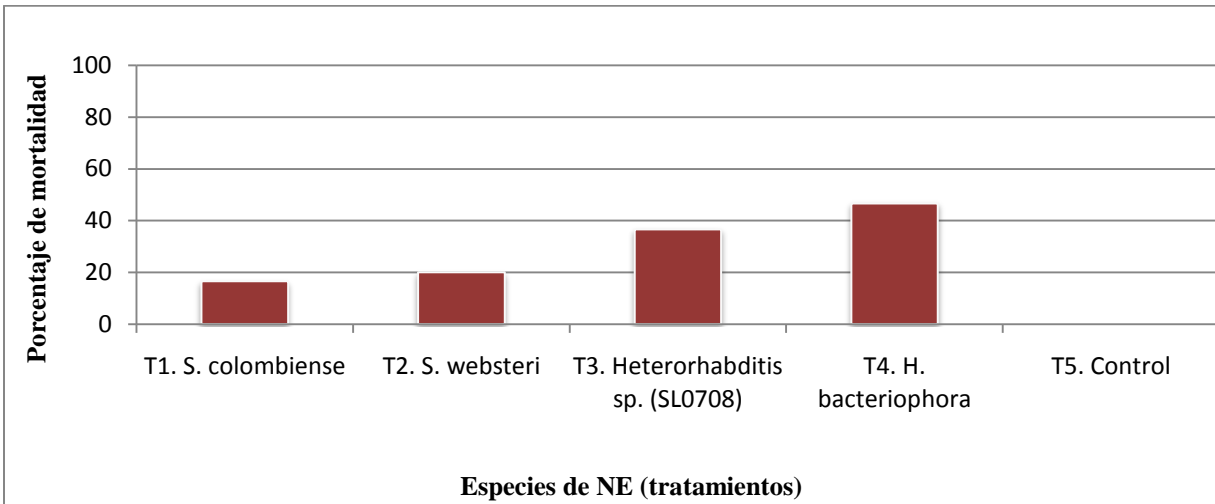
### 5.5 Diseño experimental y análisis estadístico

El primer bioensayo se organizó en un diseño completamente al azar (DCA), las especies de NE en la misma dosis de JI/larva y un testigo sin NE vs. el tercer instar larval de la plaga (*Delia platura*). El segundo bioensayo se organizó en un DCA, solo que en este las larvas de tercer instar de la plaga se expusieron a diferentes dosis de la especie de NE seleccionada en el primer bioensayo. Con el programa Statistix 8.0, se realizó una ANOVA y comparación múltiple de Tukey para establecer las diferencias significativas de los tratamientos.

## 6. RESULTADOS

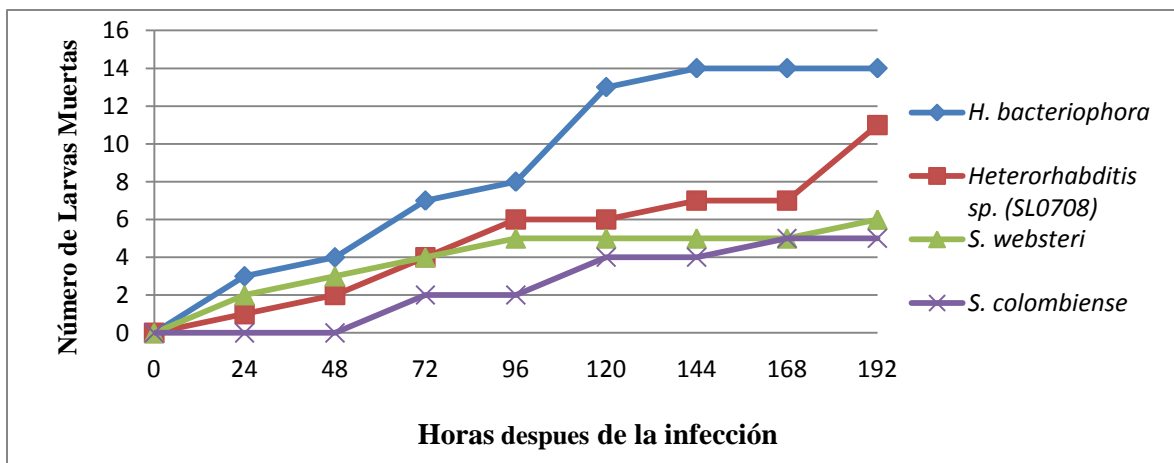
### 6.1 Patogenicidad

Los resultados obtenidos para el primer bioensayo muestran que *Heterorhabditis bacteriophora* presentó 46.6 % de mortalidad sobre *Delia platura*, seguida de *Heterorhabditis* sp. (SL0708) con 36,6%, *Steinernema websteri* con 20% y *Steinernema colombiense* con 16,6% (Fig. 3). De acuerdo a la ANOVA se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 6,21$ ;  $DF= 4$ ;  $\alpha= 0.05$ ;  $P= 0,0001$ ) y la prueba de Tukey corrobora que el tratamiento 4 correspondiente a *Heterorhabditis bacteriophora* presentó diferencias altamente significativas (Anexo 1-2).



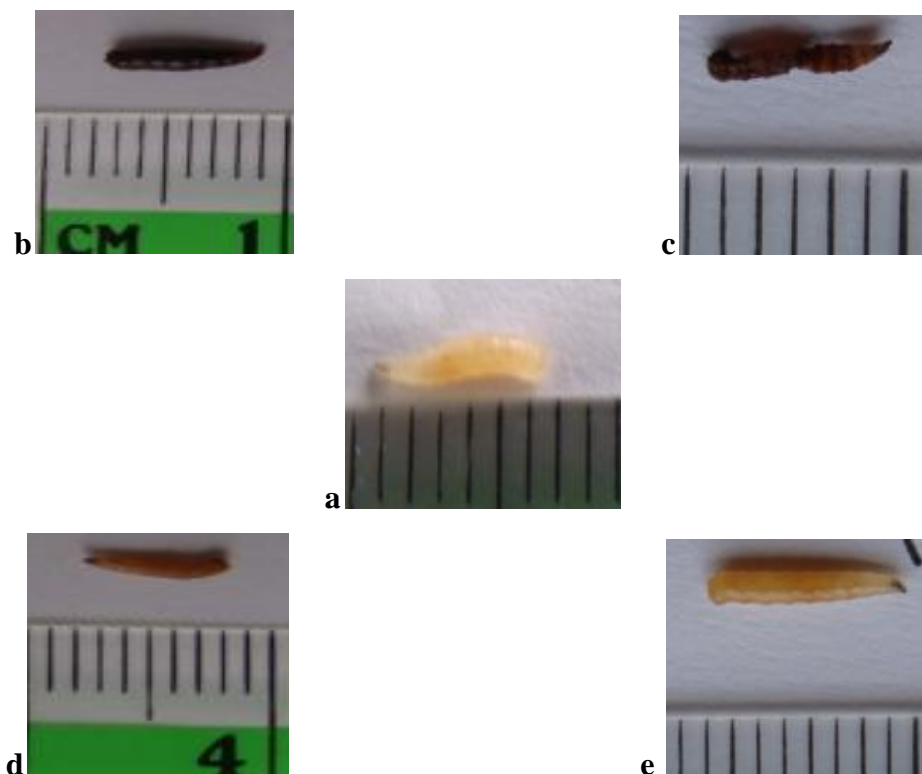
**Figura 3.** Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *Delia platura* expuestas a cuatro especies de nematodos entomopatógenos.

El tiempo de mortalidad muestra que la mayor cantidad de larvas muertas por los efectos de *Heterorhabditis bacteriophora* fue entre las 24 y 144 horas después de la infección (HDI), para *Heterorhabditis* sp. (SL0708) estuvo entre las 24 y 196 HDI mientras que para las infectadas por *Steinernema colombiense* estuvo entre las 72 y 120 HDI y *Steinernema websteri* estuvo entre las 24 y 192 HDI (Fig. 4).



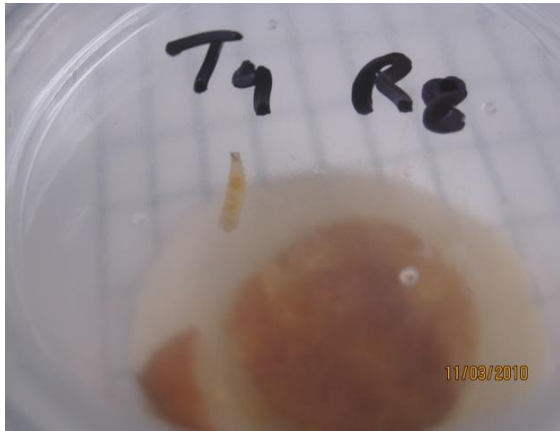
**Figura 4.** Tiempo de mortalidad de larvas de tercer instar de *Delia platura* expuestas a cuatro especies de NE en una dosis de 2500 JI/larva.

En cuanto a los síntomas de las larvas infectadas, se observó que estas tomaron una coloración típica de acuerdo a la bacteria de cada género de NE, las infectadas por el género *Steinernema*, presentaron una tonalidad amarilla, mientras las infectadas por *Heterorhabditis*, tomaron una tonalidad rojiza (Fig. 5). La disección realizada a las larvas corroboró la presencia de estados de desarrollo de los nematodos, sin embargo para *Steinernema colombiense* y algunas casos en las larvas infectadas por *Steinernema websteri*, solo se observó un JI. En las larvas infectadas por *Heterorhabditis* sp. (SL0708) y *Heterorhabditis bacteriophora* se observaron J3, J4, adultos machos y hembras, con alta densidad de individuos.



**Figura 5.** Coloración de larva sana y larvas infectadas por NE a) Larva sana, b) *Heterorhabditis bacteriophora*, c) *Heterorhabditis* sp. (SL0708), d) *Steinernema colombiense*, e) *Steinernema websteri*.

También se observó un cambio de comportamiento en el 15% de las larvas, encontrando las larvas pegadas a las paredes o a la tapa del vaso plástico y sin consumo de alimento (Fig. 6)



**a**

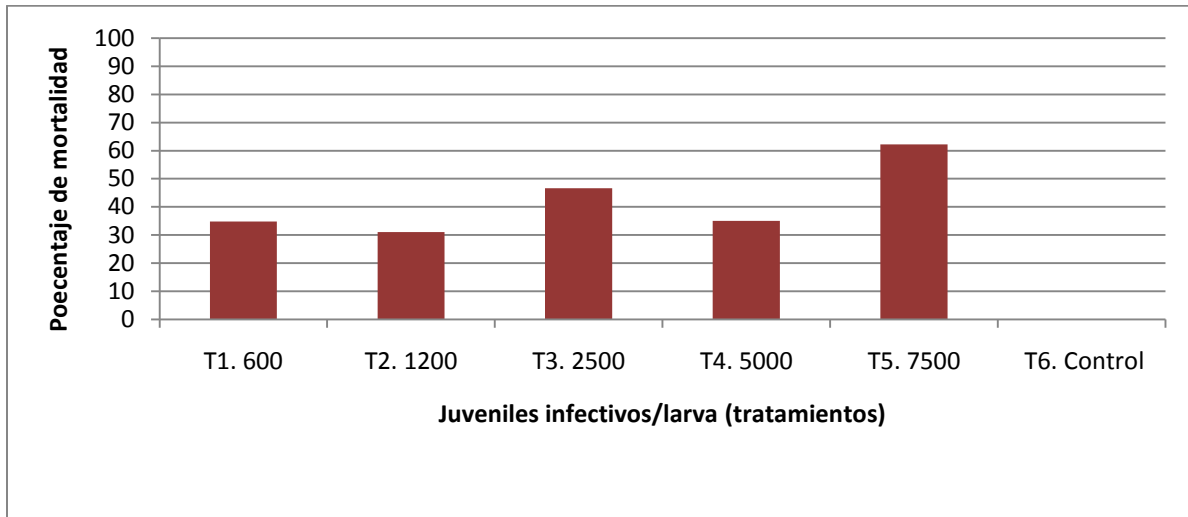


**b**

**Figura 6.** Larvas de tercer instar de *Delia platura* evitando el contacto con los NE a) larva en la tapa de la unidad experimental. b) larva en la pared de la unidad experimental.

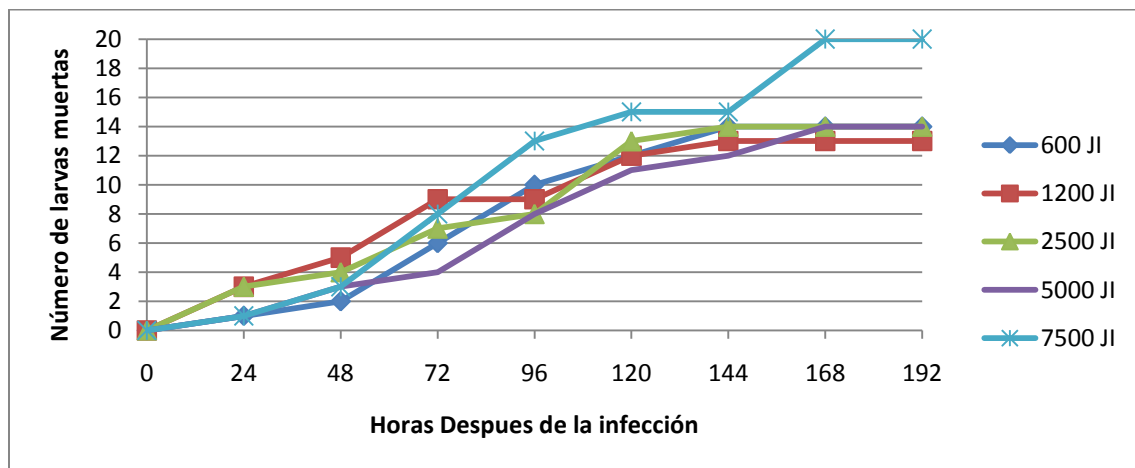
## 6.2 Dosis

Los resultados del segundo bioensayo, muestran que la dosis de 7500 JI/larva de *Heterorhabditis bacteriophora* presento porcentajes altos de mortalidad correspondientes al 62.25%, seguida de 5000 y 2500 JI/larva con 35%, mientras 1200 y 600 JI/larva con 31% y 34,8% de mortalidad respectivamente (Fig. 7). De acuerdo a la ANOVA existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 5,23$ ;  $DF= 5$ ;  $\alpha= 0.05$ ;  $P= 0,0002$ ) y se confirma que el tratamiento 5 ( 7500JI/larva) ocasionó la mayor mortalidad (Anexo 3-4).



**Figura 7.** Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *Delia platura* expuestas a cinco dosis de JI de *Heterorhabditis bacteriophora*.

El tiempo de mortalidad para las diferentes dosis de JI de *Heterorhabditis bacteriophora* muestra que todas las dosis se encuentra entre las 24 a las 168 HDI (Fig. 8).



**Figura 8.** Tiempo de mortalidad de larvas de tercer instar de *Delia platura* expuestas a cinco dosis de JI de *Heterorhabditis bacteriophora*.



## 7. DISCUSIÓN

El primer bioensayo mostró que *Heterorhabditis bacteriophora*, fue la especie que ocasionó mayor mortalidad (46.6%) en *Delia platura* en relación a las otras tres especies de NE evaluadas, como se describió en los resultados. Esto se atribuye posiblemente a la capacidad del nematodo nativo en la búsqueda del hospedero, no reconocimiento por el sistema inmune del insecto y superar las barreras de ingreso expuestas por las larvas de la mosca de la semilla, como se ha evidenciado en otros hospederos (Fenton *et al.* 2001, Sáenz 2005, Koppenhofer y Fuzy 2006). No obstante, en trabajos realizados con *Delia radicum* en condiciones similares al presente estudio y usando una dosis de 1000JI/larva reportan que *Heterorhabditis bacteriophora* no ocasiona mortalidad sobre las larvas (Chen *et al.* 2003). Resultados similares son reportados por Willmott *et al.* (2002) bajo condiciones no controladas y con una dosis de 32000 JI/planta.

Los síntomas presentados por las larvas en relación a la coloración del cadáver, son típicos de la infección por NE como se describió en los resultados, ya que las bacterias asociadas al intestino de estos, presentan diferencias en la producción de antibióticos y capacidad de absorción de colorantes, que les confieren una coloración distintiva al hospedero por los NE (Sáenz 2005). Al realizar las disecciones de las larvas, se observó estados de desarrollo (J3, J4, machos, hembras y hermafroditas) lo cual infiere que se presentó el ciclo de vida en una sola generación especialmente para *H. bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp. (SL0708). Sin embargo, para las larvas afectadas por *Steinernema colombiense* y *Steinernema websteri*, solo se encontró un J3/larva, lo cual indica que no se desarrolló la primera generación de acuerdo a la biología de estos nematodos (Sáenz 2005).

La dosis de *Heterorhabditis bacteriophora* que causó mayor porcentaje de mortalidad fue la más alta de las utilizadas, esto indica, que se requieren altas dosis de este NE para el control de *Delia platura*, lo cual coincide con lo mencionado por Chen, *et al* (2003) y Steiner 1996 en Willmott *et al.* (2002), no obstante, estos autores establecen que altas dosis de JI son ineficaces debido al uso de cepas de NE no óptimas o a factores ambientales.

El tiempo de mortalidad en todos los ensayos realizados para las 4 especies de NE fue el mismo, entre las 24 y 144 HDI, independientemente del porcentaje de mortalidad. Sin embargo, es un

rango muy amplio, teniendo en cuenta que autores como Fenton *et al.* (2001) y Sáenz (2005) plantean que la muerte del hospedero infectado por NE se presenta entre las 24 y 48 HDI, no obstante, esto posiblemente se debe a condiciones ambientales, estrategias que el hospedero tiene para limpiarse y disminución en la frecuencia de alimentación para reducir la posibilidad de ser parasitado como las mencionadas por Gaugler *et al.* 1994 en Ennis *et al.* (2010). Esto explica por qué se presentó un periodo de tiempo tan amplio para que las larvas de *Delia platura* murieran, teniendo en cuenta que en la toma de datos cada 24 horas, varias de las larvas expuestas se encontraban pegadas en la tapa de las unidades experimentales, probablemente huyendo de los NE, en otros casos la rodaja de papa criolla estaba completa, lo cual evidencia de que la larva no se alimentó, estos comportamientos son posiblemente estrategias para evitar ser parasitadas.

Otra razón del rango de tiempo tan amplio para la muerte de las larvas, posiblemente se atribuye a la morfología y cambios en su comportamiento, tales como no alimentarse, cerrar sus aberturas naturales (boca, ano, espiráculos) para evitar ser parasitadas (Coaker y Finch 1971 en Willmott *et al.* (2002), esto explica porque *Heterorhabditis bacteriophora* fue la especie que produjo más muertes a las larvas de *Delia platura*, debido a la posibilidad de utilizar un diente para perforar la cutícula de su huésped e infectarlo y ser hermafroditas en su primera generación, (Sáenz 2005).

En general los resultados obtenidos en el presente trabajo para *Heterorhabditis bacteriophora* son positivos, teniendo en cuenta que los dípteros no son el huésped por excelencia de los NE (Bélair *et al.* 2005) y que en la mayoría de los trabajos realizados sobre este orden de insectos se evalúan con Steinernematidos Harris *et al.* (1995), Jagdale *et al.* (2004) y Simard (2006), entre otros.

## 8. CONCLUSIONES

Los NE. de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* pueden infectar y matar las larvas de tercer instar de *Delia platura*, observándose diferentes estados de desarrollo de los nematodos en el hospedero.

*Heterorhabditis bacteriophora* fue la especie que mostró el mejor efecto de mortalidad sobre larvas de tercer instar de *Delia platura*.

La dosis de 7500 JI/larva de *Heterorhabditis bacteriophora* fue la más efectiva para causar una mortalidad superior al 60% en larvas de tercer instar de *Delia platura*.

## 9. RECOMENDACIONES

Realizar la cría de *Delia platura* sobre tubérculos de papa criolla, dada su facilidad de consecución, palatabilidad para las larvas y desarrollo del ciclo de vida de la mosca.

Efectuar estudios de susceptibilidad de larvas de *Delia platura* a otras especies de NE.

Evaluar bioensayos para el control de la plaga en cultivos de espinaca aplicando la mejor dosis de *Heterorhabditis bacteriophora* en invernadero y campo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Bélair, G; Wright, D. J; Curto, G. 2005. Vegetable and Tuber Crop Applications, CAB International Pp. 257-258

Capinera, J. L. 2001. Hand book of vegetable pests, ACADENIC PRESS U.S.A Pp 218-221

Chen S; Han X; Moens M. 2003. Biological control of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) with entomopathogenic nematodes, Appl. Entomol. Zool. 38 (4): 441–448.

Chen S; Han X; Moens M. 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*, *BioControl* 48: 713–724

Dent, D. 2000. Insect pest management, 2<sup>nd</sup> Edition, CABI publishing New York USA. Pp 180-185.

Ennis, D. E; Dillon, A. B; Griffin, C. T. 2010. Pine Weevils modulate defensive in response to parasites of differeng virulence, *Animal Behaviour* 80: 283-288

Fenton, A; Norman, R; Fairbairn, J. P; Hudson, P. J. 2001. Evaluating the Efficacy of Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Crop Pests: A Nonequilibrium Approach, *The American naturalist*, Vol. 158, No. 4

Gil, C. R; Carrillo, Q. D; Jiménez, G. J. 2007. Determinación de las principales plagas de la espinaca (*Spinacia oleracea*) en Cota, Colombia, *Revista Colombiana de Entomología* 33 (2): 124-128.

Gouinguene, S. P. D; Stadler, E. 2005. Comparison of the sensitivity of four *Delia* species to host and non-host plant compounds, *Physiological Entomology* 30: 62–74.

Harris, M. A; Oetting, R. D; Gardner, W. A. 1995. Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture, *Biological control* 5: 412-418.

Jagdale, G. B; Casey, M. L; Parwider, C; Lindquist, R. K. 2004. Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture, *Biological Control* 29: 296–305

Jiménez, J; Arias L. A; Fuentes, L. E; Garzón C. 2010. Recuperación en campo y cría de *Delia platura* (Diptera: Anthomyiidae) Resúmenes XXXVII Congreso Nacional de Entomología SOCOLEN.

Koppenhofer A. M; Fuzy E. M. 2006. Effect soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*, *Journal of invertebrate pathology* 92: 11-22

Lacey, L. A; Frutos R; Kaya, H. K; Vails, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, *Biological Control* 21, 230–248.

Nielsen, O. 2003. Susceptibility of *Delia radicum* to steinernematid nematodes, *BioControl* 48: 431–446.

Rodríguez, O. R; Campbell, J. F; Ramaswamy, S. B. 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored-product insect pests, *Journal of Stored Products Research* 42 (2006) 241–252

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

Shapiro-Ilan, D, I; Gouge, D. H; Piggott, S. J; Fife, J. P. 2005. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control, *Biological Control* 38 (2006) 124–133.

Simard, L; Bélair, G; Gosselin, M-E; Dionne, J. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae), a turfgrass pest on golf courses, *Biocontrol Science and Technology*, 16(8): 789-801

# ANEXOS

## Análisis estadístico

### Anexo 1

#### ANOVA para el primer bioensayo

Statistix 8.0  
p.m.

22/11/2010, 01:50:09

#### Completely Randomized AOV for tiempo120

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	4	2.5067	0.62667	4.63	0.0015
Error	145	19.6333	0.13540		
Total	149	22.1400			

Grand Mean 0.8200      CV 44.87

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups      0.01638  
Effective cell size      30.0

tratamien	Mean
1	0.8667
2	0.8333
3	0.8000
4	0.6000
5	1.0000

Observations per Mean      30  
Standard Error of a Mean      0.0672  
Std Error (Diff of 2 Means)      0.0950

**Completely Randomized AOV for tiempol144**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratamien	4	3.0267	0.75667	5.39	0.0005
Error	145	20.3667	0.14046		
Total	149	23.3933			

Grand Mean 0.8067      CV 46.46

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups      0.02054  
Effective cell size                                      30.0

**tratamien      Mean**

1	0.8667
2	0.8333
3	0.7667
4	0.5667
5	1.0000

Observations per Mean                              30  
Standard Error of a Mean                          0.0684  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0968

**Completely Randomized AOV for tiempol168**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratamien	4	2.9333	0.73333	5.05	0.0008
Error	145	21.0667	0.14529		
Total	149	24.0000			

Grand Mean 0.8000      CV 47.65

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups      0.01960  
Effective cell size                                      30.0

**tratamien      Mean**

1	0.8333
2	0.8333
3	0.7667
4	0.5667
5	1.0000

Observations per Mean                              30  
Standard Error of a Mean                          0.0696  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0984

**Completely Randomized AOV for tiempol192**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratamien	4	3.7733	0.94333	6.23	0.0001
Error	145	21.9667	0.15149		

Total 149 25.7400

Grand Mean 0.7800 CV 49.90

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.02639  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1 0.8333  
2 0.8667  
3 0.6333  
4 0.5667  
5 1.0000

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0711  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1005

**Completely Randomized AOV for tiempo24**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	4	0.22667	0.05667	1.48	0.2098
Error	145	5.53333	0.03816		
Total	149	5.76000			

Grand Mean 0.9600 CV 20.35

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 6.169E-04  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1 1.0000  
2 0.9333  
3 0.9667  
4 0.9000  
5 1.0000

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0357  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0504

**Completely Randomized AOV for tiempo48**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	4	0.42667	0.10667	1.93	0.1093
Error	145	8.03333	0.05540		
Total	149	8.46000			

Grand Mean 0.9400 CV 25.04

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.



Component of variance for between groups 0.00171  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1 1.0000  
2 0.9000  
3 0.9333  
4 0.8667  
5 1.0000

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0430  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0608

**Completely Randomized AOV for tiempo72**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	4	0.9067	0.22667	2.32	0.0597
Error	145	14.1667	0.09770		
Total	149	15.0733			

Grand Mean 0.8867 CV 35.25

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.00430  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1 0.9333  
2 0.8667  
3 0.8667  
4 0.7667  
5 1.0000

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0571  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0807

**Completely Randomized AOV for tiempo96**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	4	1.3600	0.34000	2.95	0.0221
Error	145	16.7000	0.11517		
Total	149	18.0600			

Grand Mean 0.8600 CV 39.46

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.00749  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1 0.9333

2	0.8333
3	0.8000
4	0.7333
5	1.0000

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0620  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0876

## Anexo 2

### Prueba de Tukey para el primer bioensayo

Statistix 8.0  
p.m.

22/11/2010, 01:52:42

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo120 by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A
1	0.8667	A
2	0.8333	AB
3	0.8000	AB
4	0.6000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0950  
Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2591  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo144 by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A
1	0.8667	A
2	0.8333	A
3	0.7667	AB
4	0.5667	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0968  
Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2639  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo168 by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A

1	0.8333	AB
2	0.8333	AB
3	0.7667	AB
4	0.5667	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0984  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2684  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo192 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A
2	0.8667	AB
1	0.8333	ABC
3	0.6333	BC
4	0.5667	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1005  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2741  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo24 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
1	1.0000	A
5	1.0000	A
3	0.9667	A
2	0.9333	A
4	0.9000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0504  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.1375  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo48 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
1	1.0000	A
5	1.0000	A
3	0.9333	A
2	0.9000	A
4	0.8667	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0608  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.1657  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo72 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A
1	0.9333	AB
2	0.8667	AB

3 0.8667 AB  
 4 0.7667 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0807  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2201  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo96 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
5	1.0000	A
1	0.9333	AB
2	0.8333	AB
3	0.8000	AB
4	0.7333	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0876  
 Critical Q Value 3.857 Critical Value for Comparison 0.2390  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

## Anexo 3

### ANOVA para el Segundo bioensayo

Statistix 8.0  
 p.m.

22/11/2010, 02:03:11

**Completely Randomized AOV for tiempo120**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	3.1778	0.63556	2.95	0.0139
Error	174	37.4667	0.21533		
Total	179	40.6444			

Grand Mean 0.6556 CV 70.78

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	15.8	5	0.0073
Cochran's Q	0.2002		
Largest Var / Smallest Var	4.0179		

Component of variance for between groups 0.01401  
 Effective cell size 30.0

tratamien	Mean
1	0.6333
2	0.6333
3	0.6000
4	0.6333
5	0.5000
6	0.9333

Observations per Mean 30  
 Standard Error of a Mean 0.0847  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1198

**Completely Randomized AOV for tiempol144**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	3.6444	0.72889	3.28	0.0074
Error	174	38.6667	0.22222		
Total	179	42.3111			

Grand Mean 0.6222 CV 75.76

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	16.5	5	0.0056
Cochran's Q	0.1940		
Largest Var / Smallest Var	4.0179		

Component of variance for between groups 0.01689  
 Effective cell size 30.0

tratamien	Mean
1	0.5667
2	0.5667
3	0.5667
4	0.6000
5	0.5000
6	0.9333

Observations per Mean 30  
 Standard Error of a Mean 0.0861  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1217

**Completely Randomized AOV for tiempol168**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	5.7611	1.15222	5.23	0.0002
Error	174	38.3000	0.22011		
Total	179	44.0611			

Grand Mean 0.5722 CV 81.99

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	16.4	5	0.0058
Cochran's Q	0.1950		
Largest Var / Smallest Var	4.0000		

Component of variance for between groups 0.03107  
 Effective cell size 30.0

tratamien	Mean
1	0.5333
2	0.5667
3	0.5333
4	0.5333
5	0.3333
6	0.9333

Observations per Mean 30  
 Standard Error of a Mean 0.0857

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1211

**Completely Randomized AOV for tiempo192**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	5.7611	1.15222	5.23	0.0002
Error	174	38.3000	0.22011		
Total	179	44.0611			

Grand Mean 0.5722 CV 81.99

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	16.4	5	0.0058
Cochran's Q	0.1950		
Largest Var / Smallest Var	4.0000		

Component of variance for between groups 0.03107  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1	0.5333
2	0.5667
3	0.5333
4	0.5333
5	0.3333
6	0.9333

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0857  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1211

**Completely Randomized AOV for tiempo24**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	0.17778	0.03556	0.83	0.5309
Error	174	7.46667	0.04291		
Total	179	7.64444			

Grand Mean 0.9556 CV 21.68

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups -2.452E-04  
Effective cell size 30.0

**tratamien Mean**

1	1.0000
2	0.9333
3	0.9000
4	0.9667
5	0.9667
6	0.9667

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0378  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0535

**Completely Randomized AOV for tiempo48**

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	0.3778	0.07556	0.93	0.4656
Error	174	14.2000	0.08161		
Total	179	14.5778			

Grand Mean 0.9111 CV 31.35

At least one group variance is near zero,  
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups -2.018E-04  
Effective cell size 30.0

tratamien	Mean
1	1.0000
2	0.8667
3	0.8667
4	0.9000
5	0.9000
6	0.9333

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0522  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0738

#### Completely Randomized AOV for tiempo72

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	0.9778	0.19556	1.28	0.2750
Error	174	26.6000	0.15287		
Total	179	27.5778			

Grand Mean 0.8111 CV 48.20

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	12.1	5	0.0339
Cochran's Q	0.2206		
Largest Var / Smallest Var	3.1429		

Component of variance for between groups 0.00142  
Effective cell size 30.0

tratamien	Mean
1	0.8333
2	0.7333
3	0.7667
4	0.8667
5	0.7333
6	0.9333

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0714  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1010

#### Completely Randomized AOV for tiempo96

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	5	2.0667	0.41333	2.17	0.0595

Error	174	33.1333	0.19042
Total	179	35.2000	

Grand Mean 0.7333      CV 59.51

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	13.8	5	0.0168
Cochran's Q	0.2223		
Largest Var / Smallest Var	3.9464		

Component of variance for between groups	0.00743
Effective cell size	30.0

**tratamien      Mean**

1	0.7000
2	0.7333
3	0.7333
4	0.7333
5	0.5667
6	0.9333

Observations per Mean                      30  
Standard Error of a Mean                    0.0797  
Std Error (Diff of 2 Means)                0.1127

## Anexo 4

### Prueba de Tukey para el segundo bioensayo

Statistix 8.0  
p.m.

22/11/2010, 02:04:32

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo120 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
1	0.6333	AB
2	0.6333	AB
4	0.6333	AB
3	0.6000	AB
5	0.5000	B

Alpha                                      0.05                      Standard Error for Comparison    0.1198  
Critical Q Value    4.029                      Critical Value for Comparison    0.3413  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo144 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
4	0.6000	AB



1	0.5667	B
2	0.5667	B
3	0.5667	B
5	0.5000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1217  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.3468  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo168 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
2	0.5667	B
1	0.5333	B
3	0.5333	B
4	0.5333	B
5	0.3333	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1211  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.3451  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo192 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
2	0.5667	B
1	0.5333	B
3	0.5333	B
4	0.5333	B
5	0.3333	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1211  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.3451  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo24 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
1	1.0000	A
4	0.9667	A
6	0.9667	A
5	0.9667	A
2	0.9333	A
3	0.9000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0535  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.1524  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo48 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
1	1.0000	A
6	0.9333	A
4	0.9000	A
5	0.9000	A
3	0.8667	A
2	0.8667	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0738  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.2101  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo72 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
4	0.8667	A
1	0.8333	A
3	0.7667	A
2	0.7333	A
5	0.7333	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1010  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.2876  
 There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tiempo96 by tratamien**

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
6	0.9333	A
2	0.7333	AB
3	0.7333	AB
4	0.7333	AB
1	0.7000	AB
5	0.5667	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1127  
 Critical Q Value 4.029 Critical Value for Comparison 0.3210  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.