

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE GRADUADOS



Respuesta de larvas de escarabeidos a exudados radicales solubles en agua, raíces de distintas especies forrajeras y una enmienda orgánica al suelo.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias Vegetales, Mención Protección Vegetal.

ELADIO WILFREDO ROJAS PÉREZ

**VALDIVIA - CHILE
2005**

Profesor patrocinante:

Roberto Carrillo Ll.
Ing. Agr., M.Sc., PhD.
Instituto Producción y Sanidad Vegetal.
Facultad de Ciencias Agrarias.

Profesores evaluadores:

Dolly Lanfranco L.
Prof. Biol., M.Sc.
Instituto Silvicultura.
Facultad de Ciencias Forestales.

.....
Oscar Balocchi L.
Ing. Agr., M.Sc., PhD.
Instituto Producción Animal.
Facultad de Ciencias Agrarias.

Valdivia, 28 de diciembre de 2005

DECLARACIÓN

Yo, Eladio Wilfredo Rojas Pérez, declaro que soy autor del presente trabajo, que lo he realizado en su integridad y no lo he publicado para obtener otros Grados o Títulos o en Revistas especializadas.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a todas las personas e instituciones que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Unidad de Becas Nacionales del Ministerio de Planificación de Chile, que a través de la Beca Presidente de la República, permitió financiar y completar mis estudios de Postgrado en la Universidad Austral de Chile.

Al Servicio Agrícola y Ganadero, Institución que me otorgó el patrocinio, los permisos y las facilidades para realizar mis estudios, especialmente al Sr. Alejandro Peña, Jefe del Laboratorio Regional SAG Osorno, quien permanentemente respaldó mi perfeccionamiento.

Al profesor patrocinante de la presente Tesis, Sr. Roberto Carrillo, quien orientó tanto mis estudios de Magíster, como el desarrollo de cada etapa del trabajo realizado.

A los profesores evaluadores de esta Tesis, Sra. Dolly Lanfranco y Sr. Oscar Balocchi, por sus sugerencias y correcciones, tanto al proyecto, como al trabajo experimental y escrito.

Al personal del Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Austral de Chile, por ayudarme a realizar los análisis químicos con gran amabilidad y buena disposición, en especial a la Sra. Nimia Manquián, Sra. Jessica Pozo y Sr. Ramón Mansilla.

Al personal del Laboratorio Agrícola SAG Osorno, sin cuya amistad y ayuda, no hubiera sido posible cumplir esta meta.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Mónica Gutiérrez, Angélica Catrilef, Gloria Peña, Claudia Asenjo, Denisse Duval, Oriana Oyarzo, Raúl Garcés y Rodrigo Gallardo, por su permanente colaboración y estímulo y a mi familia, especialmente mi madre y mi tía Eva, doy gracias y dedico este trabajo.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Características generales de la familia Scarabaeidae.	4
2.2	Especies de escarabeidos presentes en praderas y sementeras del sur de Chile.	4
2.2.1	Características morfológicas, ciclo estacional y otros aspectos biológicos de <i>Phytoloema herrmanni</i> .	4
2.2.2	Características morfológicas, ciclo estacional y otros aspectos biológicos de <i>Hylamorpha elegans</i> .	6
2.3	Importancia económica de los escarabeidos en praderas del Sur de Chile.	7
2.4	Relación planta-insectos subterráneos.	8
2.4.1	Respuesta de las plantas al ataque por larvas de escarabeidos.	8
2.4.2	Compuestos de las raíces que afectan la alimentación de larvas de escarabeidos.	10
2.4.2.1	Compuestos fagoestimulantes.	11
2.4.2.2	Compuestos atrayentes.	12
2.4.2.3	Compuestos inhibidores de la alimentación.	13
2.4.3	Aleloquímicos en la relación raíz-insecto.	15
2.4.3.1	Exudados radicales.	19

Capítulo	Página
2.4.3.1.1	Rol de los exudados radicales y mecanismos de liberación. 21
2.4.3.1.2	Respuestas de insectos de suelo a los exudados radicales. 21
2.5	Relaciones entre larvas de escarabeidos, raíces y materia orgánica. 23
3	MATERIAL Y MÉTODO 28
3.1	Respuesta de larvas de <i>Hylamorpha elegans</i> y <i>Phytoloema herrmanni</i> a los exudados solubles liberados por las raíces de diferentes especies pratenses. 28
3.1.1	Materiales utilizados en los experimentos 29
3.1.1.1	Ubicación de los ensayos. 29
3.1.1.2	Características de las parcelas. 29
3.1.1.3	Características de los sustratos. 29
3.1.1.4	Material biológico. 30
3.1.1.5	Fertilizantes. 31
3.1.1.6	Otros materiales. 31
3.1.2	Métodos utilizados en los experimentos. 32
3.1.2.1	Duración de los experimentos. 32
3.1.2.2	Preparación de los sustratos. 32
3.1.2.3	Establecimiento de las parcelas. 33
3.1.2.4	Fertilización. 35
3.1.2.5	Riego y control de malezas. 35
3.1.2.6	Colecta, selección e incorporación de las larvas en las parcelas. 36

Capítulo	Página
3.1.3	Evaluaciones. 37
3.1.4	Obtención de exudados para análisis. 38
3.1.4.1	Preparación de las muestras para análisis. 38
3.1.4.2	Determinación de fenoles solubles totales. 39
3.1.4.3	Determinación de azúcares solubles totales. 39
3.1.4.4	Determinación de ácidos orgánicos solubles. 40
3.2	Respuesta de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> a la presencia de raíces de distintas especies forrajeras y una enmienda orgánica al suelo. 42
3.2.1	Materiales utilizados en los experimentos. 42
3.2.1.1	Ubicación de los ensayos y características de las parcelas. 42
3.2.1.2	Material biológico. 42
3.2.2	Métodos utilizados en los experimentos. 43
3.2.2.1	Duración de los experimentos. 43
3.2.2.2	Preparación de los sustratos. 43
3.2.2.3	Establecimiento de las parcelas. 43
3.2.2.4	Fertilización. 43
3.2.2.5	Riego y control de malezas. 44
3.2.2.6	Colecta, selección e incorporación de las larvas en las parcelas. 44
3.2.3	Evaluaciones. 44
3.3	Diseño experimental de los ensayos. 44

Capítulo	Página
4	46
PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
4.1	47
Respuesta de larvas de <i>Hylamorpha elegans</i> a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses.	
Experimento 1.	
4.1.1	47
Sobrevivencia.	
4.1.2	50
Variación de peso.	
4.2	52
Respuesta de larvas de <i>Phytoloema herrmanni</i> a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses.	
Experimento 2.	
4.2.1	52
Sobrevivencia.	
4.2.2	54
Variación de peso.	
4.2.3	56
Sobrevivencia final experimento 2.	
4.2.4	57
Peso alcanzado por los distintos estados de desarrollo de <i>P. herrmanni</i> al final del experimento 2.	
4.3	58
Respuesta de larvas de <i>Phytoloema herrmanni</i> a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratense cultivadas bajo condiciones hidropónicas.	
Experimentos 3 y 4.	
4.3.1	59
Respuesta de larvas de <i>Phytoloema herrmanni</i> a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratense cultivadas en arena. Experimento 3.	

Capítulo	Página	
4.3.1.1	Sobrevivencia.	59
4.3.1.2	Variación de peso.	61
4.3.2	Respuesta de larvas de <i>Phytoloema herrmanni</i> a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratense cultivadas en lana de vidrio. Experimento 4.	62
4.3.2.1	Sobrevivencia.	62
4.3.2.2	Variación de peso.	64
4.4	Resultados de los análisis químicos al agua percolada desde los suelos con y sin plantas.	66
4.4.1	Carbohidratos totales.	66
4.4.2	Fenoles totales.	71
4.4.3	Ácidos orgánicos.	73
4.5	Respuesta de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> a la ausencia de raíces y aumento del contenido de materia orgánica en forma de estiércol en el suelo. Experimentos 5 y 6.	76
4.5.1	Respuesta de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> a la ausencia de raíces y aumento del contenido de materia orgánica en forma de estiércol en el suelo. Experimento 5.	77
4.5.1.1	Sobrevivencia.	77
4.5.1.2	Variación de peso.	78
4.5.2	Respuesta de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> a la ausencia de raíces y a una enmienda orgánica en forma de estiércol en el suelo. Experimento 6.	81

Capítulo		Página
4.5.2.1	Sobrevivencia.	81
4.5.2.2	Variación de peso.	82
5	CONCLUSIONES	84
6	RESUMEN	86
7	SUMMARY	87
8	BIBLIOGRAFÍA	88
	ANEXOS	107

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	49
2	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	51
3	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.	53
4	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada en dos fechas de evaluación.	55
5	Sobrevivencia final de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.	56
6	Peso final por estado de desarrollo de <i>P. herrmanni</i> .	58

7	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.	60
8	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.	62
9	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en arena y suelo regadados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo	63
10	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en arena y suelo regadados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo	65
11	Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.	68
12	Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	69

Cuadro**Página**

13	Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas (23/07/04).	70
14	Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.	71
15	Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas.	72
16	Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas.	72
17	Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.	74
18	Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas.	74
19	Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas.	76
20	Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.	77
21	Variación de peso larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.	79

Cuadro**Página**

22	Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> mantenidas individualmente en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.	82
----	---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Análisis de varianza de la sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	108
2	Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	108
3	Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (primera evaluación).	108
4	Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (segunda evaluación).	109
5	Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (primera evaluación).	109
6	Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (segunda evaluación).	109

Anexo	Página
7	Análisis de varianza de la sobrevivencia total final de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmannii</i> . Experimento 2. 110
8	Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo con raíces, sin raíces y mezcla suelo/estiércol 110
9	Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de segundo estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo con raíces, sin raíces y mezcla suelo/estiércol 110
10	Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo con raíces, sin raíces y mezcla suelo/estiércol (Experimento 5) 111
11	Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas. 111
12	Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas. 111
13	Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas. 112
14	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas (17/03/04). 112
15	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena(17/03/04). 112

Anexo**Página**

16	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio(17/03/04).	113
17	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas(20/04/04).	113
18	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena (20/04/04).	113
19	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (20/04/04).	114
20	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas(23/07/04).	114
21	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	114
22	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas (23/07/04).	115
23	Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	115

24	Análisis de varianza del ácido cítrico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	115
25	Análisis de varianza del ácido fumárico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	116
26	Análisis de varianza del ácido malónico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	116
27	Análisis de varianza del ácido succínico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).	116
28	Análisis de varianza del ácido cítrico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).	117
29	Análisis de varianza del ácido fumárico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).	117
30	Análisis de varianza del ácido málico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).	117
31	Análisis de varianza del ácido malónico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).	118

32	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	118
33	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>H. elegans</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.	119
34	Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.	119
35	Variación de peso de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada en dos fechas de evaluación.	120
36	Sobrevivencia final de larvas de tercer estadio de <i>P. herrmanni</i> en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.	120
37	Peso final por estado de desarrollo de <i>P. herrmanni</i> .	121

- 38 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo. 121
- 39 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo. 122
- 40 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo 122
- 41 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo. 123
- 42 Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol. 123
- 43 Variación de peso de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol. 124

1. INTRODUCCIÓN

Las larvas de escarabeidos producen daños importantes en praderas y sementeras del sur de Chile. Las principales especies que causan perjuicios en esta zona son *Phytoloema herrmanni* e *Hylamorpha elegans*, de las cuales se han estudiado algunos aspectos de su biología, comportamiento y combate cultural mediante insecticidas y organismos biológicos. Sin embargo, su relación con las plantas de las cuales se alimentan, tanto en la respuesta de la planta a las larvas de escarabeidos, como el efecto de las plantas sobre las larvas, ha recibido una atención menor. Algunos estudios señalan que estas larvas presentan una mejor condición al alimentarse de raíces de gramíneas que leguminosas (ROJAS, 1994) y otros estudios señalan que estas larvas son capaces de sobrevivir en suelo en la ausencia de raíces (FRESARD, 1992). Por otra parte, la relación entre las plantas y las larvas de escarabeidos, en estudios realizados en laboratorio, no muestran una respuesta agregativa a la presencia de plantas (PAPE, 2001; CARRILLO *et al.*, 2004). Otros estudios muestran que la sobrevivencia de las larvas en suelo con y sin vegetación es similar, aún cuando en presencia de raíces de plantas, las larvas presentan una mejor condición.

Menos aún se conoce acerca de las interacciones entre insectos en general y los exudados liberados por las raíces de plantas, tal como se ha comprobado que existe en otras especies de animales y microorganismos, en forma similar a los fenómenos alelopáticos planta-planta, aunque existen ensayos que hacen pensar que el crecimiento y desarrollo de larvas de escarabeidos pudiera ser afectado por compuestos químicos presentes en el suelo donde ellas habitan.

El estudio de las interacciones entre insectos subterráneos y las raíces de plantas ha permanecido como un campo inexplorado de investigación, que sólo en los últimos años está recibiendo alguna atención y el aislamiento y purificación de los

compuestos ha estado ligado principalmente a la búsqueda de nuevos ingredientes que aminoren o sustituyan las aplicaciones de agroquímicos y la exploración de nuevos fármacos para la salud humana.

En este trabajo se estudia en primer lugar la respuesta de larvas de tercer estadio de *H. elegans* y *P. hermanni* a la aplicación de exudados solubles en agua liberados por las raíces de distintas especies forrajeras, a fin de establecer si cumplen una relación en la interacción planta-insecto. En un segundo lugar se determina la respuesta de larvas de segundo estadio de *P. hermanni* a la ausencia de raíces y a una enmienda orgánica del suelo en forma de estiércol.

Las hipótesis formuladas en este estudio son las siguientes:

1) Las larvas de tercer estadio de *H. elegans* y *P. hermanni* son afectadas en su peso y sobrevivencia, al ser expuestas a exudados solubles en agua de diferentes especies forrajeras.

2) Las larvas de segundo estadio de *P. hermanni* presentan mayor peso y sobrevivencia en un suelo con enmienda orgánica que en el mismo suelo con presencia de raíces de distintas especies forrajeras.

OBJETIVOS

Establecer la respuesta de larvas de tercer estadio de *H. elegans* y *P. hermanni*, a la aplicación de exudados solubles en agua liberados por las raíces de distintas especies forrajeras.

Analizar la composición de exudados radicales solubles en agua, liberados por las raíces de distintas especies de plantas.

Determinar la capacidad de distintos substratos para retener exudados radicales solubles en agua, liberados por las raíces.

Establecer la respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a suelo con presencia de raíces y con una enmienda orgánica en forma de estiércol.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales de la familia Scarabaeidae

La familia Scarabaeidae pertenece taxonómicamente al orden Coleoptera, suborden Polyphaga, serie Haplogastra y superfamilia Scarabaeioidea (Blackwelder, citado por ETCHEVERRY y HERRERA, 1972). Los adultos son conocidos como escarabajos, sanjuanés y pololos; mientras que las larvas son conocidas como gusanos blancos, gallinas ciegas, gusanos del pasto, etc. (RITCHER, 1966; CORONADO y MÁRQUEZ, 1972).

2.2 Especies de escarabeidos presentes en praderas y sementeras del sur de Chile.

En Chile, el problema de las larvas de escarabeidos comprende exclusivamente especies nativas que han llegado a ser dañinas en zonas antes boscosas y que hoy están dedicadas casi totalmente a la agricultura (DURAN, 1952; 1954; 1976). El año 1954, el mismo autor elaboró un listado de los escarabeidos perjudiciales presentes en la zona sur de Chile indicando las siguientes especies: *Hylamorpha elegans* (Burm.), de la subfamilia Rutelinae y *Phytoloema herrmanni* Germ., *Sericoides germaini* D.T., *Schizochelus breviventris* Phil. y *Phytoloema mutabilis* (Sol.) todas ellas de la Subfamilia Melolonthinae.

De este complejo, las especies más conocidas y más estudiadas en la zona sur de Chile corresponden a *H. elegans* (pololo verde chico) y *P. herrmanni* (pololo café chico) (AGUILERA y CISTERNAS, 1999), probablemente debido a las altas densidades que alcanzan y su daño.

2.2.1 Características morfológicas, ciclo estacional y otros aspectos biológicos de *Phytoloema herrmanni*.

Los adultos de este pololo café presentan su cuerpo de color castaño brillante, miden aproximadamente 13 mm de largo, con los élitros ligeramente más claros (ARTIGAS, 1994), se caracterizan por no

alimentarse (RIVERA, 1904; DURAN, 1954 y 1976; CISTERNAS y CARRILLO, 2001).

En relación a sus estados preimaginales, éstos, al igual que otras especies presentes en la zona sur de Chile, han sido descritos por CISTERNAS (1986). En general, *P. herrmanni* presenta larvas de tipo escarabeiformes, cilíndricas, formando en reposo una típica letra C, con tres pares de patas torácicas. Presentan 3 estadios larvales, que se diferencian entre si por su tamaño, siendo las larvas del primer estadio de color blanco translúcido y amarillo pálido al término de su estado larval. Estas larvas presentan el tergo del último segmento abdominal densamente cubierto por numerosas setas cortas, medianas y largas, dirigidas hacia el extremo posterior. La abertura anal presenta la forma de "Y" con dos lóbulos ventrales y uno dorsal cubiertos por setas de diversos tamaños.

Con respecto a su ciclo estacional, CISTERNAS y CARRILLO (2001) señalan que su duración es de un año en el sur de Chile. El insecto adulto vuela entre fines de septiembre hasta fines de octubre, período durante el cual las hembras ponen sus huevos preferentemente al colonizar nuevas praderas, en suelos con reducida cubierta vegetal. De los huevos emergen pequeñas larvas de 5 mm de largo en un período aproximado de 30 días. Estudios anteriores señalan que la actividad larval de esta especie puede variar de 10 a 11 meses, apareciendo las larvas los primeros días de diciembre y en julio alcanzan todo su desarrollo, comenzando a bajar hasta profundidades de 30 ó 40 cm DURAN (1954). El mismo autor señala que el estado de pupa dura un período de 2 y eventualmente 3 meses.

Cuando las poblaciones sobrepasan las 1000 larvas por metro cuadrado, el efecto del ataque se puede comenzar a ver temprano en el otoño, alcanzando su máxima expresión desde mediados de esta estación hasta fines de invierno (agosto) (CISTERNAS y CARRILLO, 2001).

2.2.2 Características morfológicas, ciclo estacional y otros aspectos biológicos de *Hylamorpha elegans*. El adulto del pololo verde es de color verde claro o verde ceniciento (CISTERNAS, 1986) se alimenta de hojas de roble (DURAN, 1952 y 1976) y otras especies forestales y frutales (GONZALEZ, 1989). Según CISTERNAS (1986) esta especie presenta 3 estadios larvales y al igual que *P.herrmanni*, la larva es del tipo escarabeiforme, cilíndrica y forma en reposo un típica letra "C", con tres pares de patas torácicas. Su color es blanco hialino durante los primeros estadios tornándose amarillo pálido al término del tercer estadio. Estas larvas presentan el tergo del último segmento abdominal con el dorso pobremente cubierto por setas de diferentes tamaños, dirigidos hacia la región posterior. La abertura anal es curvada transversalmente y presenta dos lóbulos (uno dorsal y uno ventral) cubiertos por setas largas y cortas.

En el sur de Chile, el ciclo de vida de esta especie dura aproximadamente 1 año, ocasionado el mayor daño entre los meses de junio y agosto (DURAN, 1976; ARTIGAS, 1994). Según DURAN (1952), en la provincia de Cautín, el período de actividad larval comprende desde mediados de enero a principios de septiembre y el período de pupa abarca los meses de septiembre, octubre y aún noviembre. Según AGUILERA y CISTERNAS (1999) el período de vuelo de esta especie en la IX región comienza en noviembre y finaliza aproximadamente a mediados de febrero.

Durante las primeras etapas larvarias este insecto no se alimenta de las raíces de plantas o al menos esta alimentación es insignificante. Sin embargo, en junio y julio en Cautín los daños a las sembraderas de cereales, especialmente de trigo y avena, son evidentes (DURAN, 1952). Según el mismo autor, las larvas de esta especie viven superficialmente en terrenos agrícolas, no enterrándose mas allá de los 20 cm, ubicándose generalmente entre los 5 y 10 cm de profundidad y el nivel normal de población sería 10 a 25 larvas/m², pero se ha podido encontrar poblaciones máximas de 300 larvas/m².

2.3 Importancia económica de los escarabeidos en praderas del Sur de Chile.

Las larvas de escarabeidos son de importancia económica debido a que se alimentan preferentemente de raíces de plantas y los adultos presentan una acción desfoliadora principalmente en árboles y arbustos (RITCHER, 1958).

En Chile, OLALQUIAGA (1961) y NORAMBUENA y AGUILERA (1988) señalan que las especies que cobran mayor importancia para las forrajeras son aquellas que obstaculizan el establecimiento del cultivo y reducen la productividad al alimentarse del sistema radical, lo que se traduce en la aparición de manchas amarillentas y posteriormente sectores de suelo desprovistos de vegetación .

Según RADCLIFFE (1971) las altas poblaciones de gusanos blancos alteran marcadamente la composición botánica de las praderas ya sea por la alimentación selectiva de una o mas especies o por la alimentación indiscriminada de todas las especies.

ARTIGAS (1994) señala que el ataque de *H. elegans* junto a otras especies del complejo de los gusanos cortadores subterráneos en las praderas del sur de Chile, produce pérdidas permanentes, estimada en un séptimo de la carga anual por hectárea, siendo considerada además una de las especies más dañinas para el trigo en la VIII y X región donde los ataques severos llegan a ocasionar pérdidas de hasta el 80% de las plántulas de trigo, obligando a resembrar totalmente. Por su parte, en relación al ataque producido por *P. herrmanni*, CISTERNAS y CARRILLO (2001) informan que no se han establecido claramente los niveles de daño producidos por este insecto en las praderas pero que año a año se conoce del ataque a vastas extensiones, con la destrucción del 100% de las praderas en algunos predios.

2.4 Relación planta-insectos subterráneos.

En términos generales, la interacción planta-herbívoro ha sido objeto de una activa investigación ecológica en los últimos años. Sin embargo, la herbivoría por insectos subterráneos ha sido virtualmente inexplorada. Aunque ha recibido considerable atención en la agricultura en la medida que muchas de las especies constituyen plagas de importancia económica(BROWN y GANGE, 1990).

Desde un punto de vista ecológico, VAN DER PUTTEN (2002), indica que los herbívoros y patógenos de raíces afectan los patrones espaciales y temporales en las comunidades de las plantas, y si estos patrones son cíclicos o irreversibles depende de las características del herbívoro, las interacciones con otros organismos bajo o sobre el suelo y la tasa de cambios en el ambiente abiótico.

Los insectos que se alimentan de raíces tienen que mantenerse con una fuente alimenticia, la cual, aunque abundante, puede ser de una calidad muy baja y como resultado de ello, a menudo estos insectos tienen largos ciclos de vida y por lo tanto tienden a ser residentes de comunidades vegetales establecidas (BROWN y GANGE, 1990).

Según WALKER *et al.*, (2003), el estudio de las interacciones planta-insecto mediado por señales químicas ha estado muy confinado a las hojas y tallos, mientras que el estudio de la comunicación raíz-insecto ha permanecido grandemente inexplorado debido a la complejidad de la rizósfera y a la falta de sistemas experimentales apropiados.

2.4.1 Respuesta de las plantas al ataque por larvas de escarabeidos.

La remoción del tejido radical por insectos herbívoros de suelo, puede resultar en una diversidad de respuestas en sus plantas hospederas, que van desde cambios en la raíz, proporción de brotes, ubicación del carbono y nitrógeno en la planta hasta la muerte de las mismas. Los

efectos de la herbivoría sobre las raíces de las plantas no están restringidos a la pérdida del tejido radical. Así por ejemplo, en praderas mixtas, la alimentación de las raíces puede reducir la productividad primaria neta anual 16 veces más que lo que realmente es consumido (Ingham y Detling, 1990, citados por HUNTER, 2001).

Los herbívoros de las raíces pueden causar pérdidas de las proteínas desde las raíces, una reducción en los carbohidratos de reservas no estructurales de la raíz y subsecuentemente la mortalidad de la planta (GODFREY *et al.*, 1987). Sin embargo, las plantas infestadas por insectos que se alimentan de raíces pueden también exhibir aumentos en el contenido de nitrógeno de la raíz y una reducción en el contenido de nitrógeno foliar, reflejando una redirección del nitrógeno hacia las raíces (HUNTER, 2001).

Según RIDSDILL-SMITH, (1977) la relación entre la cantidad de alimentación por larvas de escarabeidos y el nivel resultante de daño económico generalmente es complejo, ya que estas larvas se alimentan del sistema radical de las plantas forrajeras y la parte económicamente importante de ellas es el follaje. El mismo autor afirma que la pérdida de rendimiento en la parte de la planta que es consumida puede ser proporcional a la cantidad de insectos que se alimentan de ella, la planta puede compensar las mermas producidas por el insecto mediante el incremento en su tasa de crecimiento o bien las pérdidas por la alimentación pueden exceder el consumo efectuado por el insecto, Por lo tanto, las pérdidas de rendimiento de follaje depende de las relaciones entre el crecimiento radical y foliar y puede ser igual ,menor o mayor que la pérdida en el rendimiento de raíces. Al respecto DAVIDSON *et al.*, (1970) agregan que ciertas plantas afectadas por larvas de escarabeidos son capaces de perder sobre el 50% del sistema radical sin que se produzca una disminución significativa en el rendimiento de follaje. Algunos experimentos en invernadero realizados por ROJAS (1994) indican

que algunas especies forrajeras a bajas densidades pueden sobrecompensar el daño efectuado a las raíces por larvas de escarabeidos.

2.4.2 Compuestos de las raíces que afectan la alimentación de larvas de escarabeidos. El hecho que muchas especies de insectos que se alimentan de raíces muestren preferencias por distintas plantas hospederas sugiere que hay ciertos compuestos químicos en las raíces de las plantas que aumentan o inhiben la alimentación larval (BROWN y GANGE, 1990). Ya en el año 1965, Beck postulaba que los requerimientos nutricionales de los insectos no serían un factor determinante en la especificidad por una determinada planta, debido a que todos los insectos tendrían similares requerimientos nutricionales esenciales, por lo que la especificidad del insecto y la resistencia de la planta debiera estar basada en la presencia de sustancias bioquímicas secundarias (BECK, 1965).

Los compuestos químicos involucrados en las respuestas conductuales de los insectos que se alimentan de raíces pueden ser fagoestimulantes, atrayentes, e inhibidores (BROWN y GANGE, 1990), de tal manera que los insectos fitófagos localizan los hospederos por respuestas de orientación hacia el hospedero más que por movimientos aleatorios (SUTHERLAND, 1972; DOANE *et al.*, 1975; BRANSON, 1982). A continuación se presenta una breve revisión de los compuestos fagoestimulantes, atrayentes e inhibidores informados en algunos trabajos, muchos de ellos aún no estudiados en detalle para larvas de escarabeidos, pero que podrían estar involucrados en sus relaciones con sus plantas hospederas. En general estos compuestos pueden presentar respuestas diversas por parte de los herbívoros, relacionado esto a sus rangos de hospederos, es decir, un mismo compuesto puede ser tóxico o inhibidor de la alimentación para una especie de insecto, pero ser estimulante para otra. Por otra parte, muchas veces las respuestas de un determinado insecto

pueden estar afectadas por compuestos que actúan de forma conjunta.

2.4.2.1 Compuestos fagoestimulantes. El almacenaje de carbohidratos en los tejidos subterráneos de la planta promueve un suministro alimenticio con un alto contenido energético (BROWN y GANGE 1990). Según Dadd, 1977, citado por CHAPMAN (2003), los azúcares son fagoestimulantes para todos los insectos fitófagos estudiados y las células en una o más sensilas del aparato bucal de larvas y adultos de coleópteros, dípteros y lepidópteros, responden a ellos, principalmente la sacarosa. Pruebas con un gran número de carbohidratos puros, aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas han indicado que la ingestión es regulada por una respuesta gustatoria positiva a algunos de ellos (SUTHERLAND y HILLIER, 1974 a y b). LADD (1988) señala que las larvas de tercer estadio de *Popillia japonica* es estimulada en su alimentación por la sacarosa, maltosa glucosa y trehalosa, mientras que SUTHERLAND (1971) informó que la sacarosa constituía el 50 % del contenido de azúcares solubles totales en las raíces de *Lolium* spp. y demostró que este compuesto era un fagoestimulante importante para larvas del escarabeido *Costelytra zealandica* (White). El mismo autor informa que tanto las larvas de *Heteronychus arador* (Burm.) como de *C. zealandica* son estimuladas por fructosa sacarosa, glucosa y maltosa. La sacarosa, maltosa y glucosa también han sido identificadas como estimulantes alimenticios para las larvas del escarabeido australiano *Sericesthis geminata* (Boisduval)(Wensler y Dudzinski citados por LADD, 1988).

Por otra parte, SUTHERLAND y HILLIER (1974a) indican que las larvas de tercer estadio de *C. zealandica* también son estimuladas por varios aminoácidos entre los cuales se señalan al ácido L-aspártico, L-glutámico y L-serina. El ácido ascórbico también fue un fuerte estimulador de la alimentación e inducía una fuerte respuesta en combinación con la sacarosa.

2.4.2.2 Compuestos atrayentes. El CO₂ parece ser uno de los principales compuestos químicos mediante los cuales los insectos que se alimentan de raíces se orientan en el suelo. Este es un metabolito primario liberado desde las raíces durante el proceso de respiración (BROWN y GANGE, 1990), por la materia orgánica en descomposición en el suelo, así como por las raíces de plantas vivas. Los insectos fitófagos y saprófagos pueden usar el CO₂ para localizar su fuente alimenticia (VILLANI y WRIGHT, 1990). Complementario a esto, BERNKLAU y BJOSTAD (1998 a y b) informan que el CO₂ es atractivo a un gran número de invertebrados del suelo incluyendo larvas de insectos, insectos adultos, ácaros, nemátodos y bacterias. Por ejemplo, ROBINSON (1995) encontró que varios nemátodos son atraídos a gradientes de flujo de CO₂ y STRNAD *et al.*, (1986) y Bjostad, 1988, citado por ANDERSEN, (1987) señalan la atracción por el compuesto en escarabajos del género *Diabrotica* spp hacia las raíces. También en *C. zealandica*, SUTHERLAND (1972) y GALBREATH (1988) indican la existencia de esta respuesta. DOANE *et al.*, (1975), en relación a un trabajo previo realizado por Klinger, el año 1975, señalan que la aparente respuesta de larvas de elatéridos *Agriotes* spp al CO₂ demostrada por Klinger, el año 1957 tiene implicancias importantes para la orientación y conducta alimenticia, fisiología, biología general, ecología y control de esas larvas. Adicionalmente, otros estudios han permitido confirmar que el CO₂ es el único compuesto atractivo a larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte a las raíces de maíz (BERNKLAU y BJOSTAD 1998 a y b), lo que sugiere la posibilidad de obtener un nuevo método de control a través del desarrollo de formulaciones que generen CO₂ aplicadas al suelo, para causar la desorientación y prevenir la localización de las raíces por las larvas (BERNKLAU y BJOSTAD 1998 a).

VILLANI y WRIGHT (1990), señalan que el CO₂ no es específico a una fuente alimenticia en particular, por lo que los insectos con rangos de hospederos mas restringidos deben

depender de compuestos químicos vegetales adicionales más específicos, mezclas químicas o señales no químicas que el insecto encuentra una vez que intenta alimentarse sobre la planta. Para insectos con un amplio rango de hospederos, tales como larvas de escarabeidos y gusanos alambre, el CO₂ quizás en combinación con exudados no específicos de las raíces de las plantas podría ser adecuado para encontrar al hospedero (JONES y COAKER, 1978). Según estos mismos autores, la atracción al CO₂ y otros metabolitos primarios sería una característica primitiva común a muchos insectos saprófagos subterráneos y que la evolución hacia especialistas fitófagos estaría asociada con la habilidad de estos últimos para orientarse hacia compuestos químicos vegetales secundarios.

2.4.2.3 Compuestos inhibidores de la alimentación. Existen evidencias que la herbivoría subterránea afecta negativamente el potencial biótico de las plantas, lo que se demuestra por el hecho que los tejidos subterráneos contienen frecuentemente metabolitos que pueden actuar como inhibidores alimenticios (MCKEY, 1979).

Según RUSSELL *et al.*, (1979) las plantas contienen una diversidad de compuestos sin un rol obvio en el metabolismo primario, los que son llamados metabolitos secundarios, la función primaria de estos compuestos es mantener la integridad de la planta frente a competidores, depredadores y patógenos por lo que, en muchos casos, la presencia de estos compuestos tóxicos que inhiben la alimentación, se relaciona con la resistencia de las plantas.

Muchos metabolitos secundarios parecen tener múltiples funciones (SEIGLER y PRICE, 1976; EINHELLIG, 1996; SEIGLER, 1996), los cuales pueden servir como compuestos antiherbívoros, antifúngicos, antiparásitos, antibacterianos, como fitotoxinas, reguladores internos del crecimiento y desarrollo, estimuladores de la germinación de semillas, etc., pero todo lo anterior,

sumado a la presencia de interacciones y la presencia en una planta de más de un compuesto activo, hacen muy difícil la interpretación de resultados en experimentos basados en un sólo compuesto (SEIGLER, 1996). Por ejemplo, en algunos estudios de alelopatía se ha encontrado que algunas especies de sorgo contienen glucósidos cianogénicos, taninos, flavonoides y una serie de ácidos fenólicos, todos ellos tienen actividad inhibitoria y la mayoría de ellos producen diferentes lesiones biológicas (Einhellig, 1995, citado por ZENG *et al.*, 2001). Por otra parte, ROSENTHAL y JANSEN (1979) indican que en general los compuestos químicos nocivos para insectos pueden variar desde moléculas simples tales como el ácido oxálico y cianida a glucósidos cianogénicos complejos, alcaloides, lípidos tóxicos, terpenoides, saponinas, flavonoides, taninos y ligninas.

Con relación a lo anterior, RAMOS *et al.*, (1998) indican que los compuestos secundarios frecuentemente se agrupan según las sustancias químicas que los constituyen en: compuestos fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas); toxinas nitrogenadas (alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de las proteasas); terpenos (lactonas sesquiterpénicas, glucósidos cardíacos, saponinas); hidrocarburos poliacetilénicos y oxalatos. Entre estos compuestos, los compuestos fenólicos han sido los más estudiados en relación a su fitotoxicidad (Putnam, 1985, citado por CHUNG *et al.*, 2001).

El hecho que la conducta alimenticia de insectos pueda ser regulada por metabolitos secundarios, tales como los flavonoides, sugiere que los insectos son capaces de percibir estos compuestos (SIMMONDS, 2003). Por ejemplo, las larvas de lepidópteros tienen receptores sensoriales en las neuronas de sus sensilas maxilares estilocónicas que responden tanto a los fagoestimulantes como a los inhibidores alimenticios (Schoonhoven, 1982, citado por SIMMONDS, 2001). La misma autora señala que aunque existe evidencia que algunos ortópteros y

lepidópteros tienen receptores del sabor que responden a los fenoles, aún se desconoce mucho sobre la especificidad de estos receptores y si ellos diferencian entre diferentes grupos de flavonoides, tales como, chalconas, flavonas, flavonoles, e isoflavonas.

Los metabolitos secundarios presentes en el follaje de las plantas y que actúan como inhibidores de la alimentación en insectos pueden también estar presentes en el sistema radical (MCKEY, 1979; BROWN y GANGE, 1990).

Existe muy poca información acerca de las respuestas de larvas de escarabeidos a estos metabolitos. Sin embargo, los estudios sobre la base química de la resistencia de *Lotus pedunculatus* Cavanilles al escarabeido *C. zealandica* realizados por GNANASUNDERAM y SUTHERLAND (1986) llevaron al aislamiento de un grupo de compuestos alifáticos identificados como el triéster caracina y los diésteres coronarina y cibarina, los cuales junto a varios otros ésteres del ácido nitropopiónico habían sido señalados previamente como inhibidores de la alimentación y tóxicos a larvas de tercer estadio de este escarabeido. Por su parte RUSSELL et al., (1984) informaron de la presencia de dos 2-arilbenzofuranos presentes en *Onobrychis viciifolia* llamados sainfurano y metilsainfurano, los cuales presentaban actividad inhibidora de la alimentación para larvas de *C. zealandica*. Otros experimentos con larvas del mismo escarabeido han demostrado que de 36 isoflavonoides, incluyendo isómeros ópticos, probados para determinar su efecto inhibitorio de la alimentación, 18 fueron activos. De éstos, la faseolina y rotenona fueron particularmente activos a concentraciones tan bajas como 1 µg/g (LANE et al., 1985).

2.4.3 Aleloquímicos en la relación raíz-insecto. Se denominan aleloquímicos a aquellos compuestos químicos liberados desde las plantas que presentan un efecto alelopático (KRUSE et al., 2000).

El término alelopatía fue introducido por Molisch en 1937 y se deriva de las palabras griegas "allelon" una a la otra y "pathos" daño y significa el efecto dañino de uno sobre el otro (Rizvi et al., 1992, citado por KRUSE et al., 2000). Sin embargo, actualmente se acepta que el término cubre efectos tanto estimulatorios como inhibitorios de una planta sobre otra (RICE, 1984). Desde tiempos de Molisch, el concepto de alelopatía se ha extendido para incluir cualquier interacción organismo-organismo mediada por la liberación y subsiguiente recepción de compuestos orgánicos (aleloquímicos) que resultan en alguna consecuencia beneficiosa o perjudicial al receptor. De este modo, las interacciones planta-animal superior y planta-insecto han llegado a ser incluidas en publicaciones sobre alelopatía (STURZ y CHRISTIE, 2003). Acerca de esto mismo, KRUSE et al., (2000) informan que algunos usan el término en un sentido más amplio, por ejemplo los entomólogos, quienes incluyen los efectos de los compuestos secundarios sobre las interacciones planta-insecto. Por su parte, ANAYA y CRUZ-ORTEGA (2001) indican que la última definición de alelopatía fue postulada en el Primer Congreso Mundial de Alelopatía, realizado en Cádiz, España e intenta abarcar la vastedad y complejidad del fenómeno describiéndolo como: "la alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influya sobre los sistemas biológicos".

En una revisión de la alelopatía en sistemas agrícolas, SEIGLER (1996), agrega que la alelopatía resulta cuando los organismos vivos producen moléculas bioactivas, las cuales pueden entrar al ambiente y producir efectos directos o indirectos sobre el crecimiento y desarrollo de individuos de la misma o de otras especies. Uno de los ejemplos más clásicos de alelopatía es el del efecto inhibitorio en la germinación de semillas y el crecimiento de otras plantas cultivadas, tales como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y la lechuga

(*Lactuca sativa* L.), por diferentes especies del género *Juglans*, cuyo compuesto activo se piensa que es la naftoquinona juglona (RICE, 1984; SEIGLER, 1996).

En muchos experimentos de laboratorio ha sido posible demostrar que varios metabolitos secundarios de las plantas tienen profundos efectos fisiológicos en otras plantas, hongos y bacterias y otros ensayos tanto de campo como de laboratorio han demostrado que un gran número de plantas inhiben el crecimiento de otras plantas pero es difícil identificar los compuestos relacionados a estas respuestas y establecer que el compuesto realmente entra al ambiente y se moviliza bajo las condiciones imperantes (SEIGLER, 1996).

NIEMEYER (1988), señala que los ácidos hidroxámicos son glucósidos presentes en todas las partes de las plantas de centeno, maíz y trigo que han sido asociados con la resistencia de cereales a insectos, hongos y bacterias, detoxificación de herbicidas y con efectos alelopáticos de los cereales.

La inhibición alelopática resulta típicamente de la acción combinada de un grupo de aleloquímicos que interfieren colectivamente con varios procesos fisiológicos (EINHELLIG, 1996). Los aleloquímicos pueden ser selectivos en su acción o las plantas pueden ser selectivas en sus respuestas (ZENG *et al.*, 2001). La mayoría de los aleloquímicos se clasifican como metabolitos secundarios y son elaborados como productos colaterales de las vías metabólicas primarias de las plantas. A menudo, su función en la planta es desconocida, pero se sabe que algunos de ellos tienen funciones estructurales (por ejemplo como intermediarios de lignificación) o juegan un rol en la defensa general contra herbívoros y patógenos vegetales (KRUSE *et al.*, 2000).

Los aleloquímicos pueden estar presentes en varias partes de la planta (raíces, hojas, rizomas, tallos, polen, semillas y flores) y son liberados en el ambiente por la exudación de las raíces, lixiviación desde la parte aérea y volatilización y/o

por descomposición del material vegetal (RICE, 1984). Sin embargo, algunos compuestos, tales como los fenoles, pueden no ser exudados o lixiviados desde las plantas bajo condiciones naturales, por lo cual, para establecer la real participación de estos compuestos en estudios de alelopatía, es deseable coleccionar información sobre 1) la concentración bioactiva de los fenoles en el medio (es decir si las concentraciones a las cuales ellos son activos, se presentan en realidad en el ambiente); 2) el tiempo de permanencia y su disponibilidad y 3) la actividad aditiva o parcialmente antagónica de los compuestos fenólicos (INDERJIT, 1996).

Algunos informes señalan que, aunque la alelopatía parece estar basada genéticamente, para una aplicación óptima de este fenómeno bajo condiciones de campo, es necesario considerar que la producción y liberación de aleloquímicos se ve influenciada por factores bióticos y abióticos, tales como, edad de la planta, temperatura, luz y condiciones del suelo, microflora, estado nutricional y tratamientos con herbicidas (Duke, 1985; Hoagland y Williams, 1985, citados por OLOFSDOTTER, 2001).

En relación a la especificidad de los compuestos aleloquímicos, se ha demostrado que varios de ellos poseen un amplio espectro de actividad. Es el caso de los resultados obtenidos por Wink y otros el año 1998 con más de 70 alcaloides, indicando que la mayoría de estos compuestos son tóxicos o inhibidores a más de un grupo de organismos, incluyendo plántulas, bacterias, insectos y mamíferos, para lo cual concluyen que los alcaloides se pueden considerar como multipropósito debido a su amplio rango de actividad (KRUSE *et al.*, 2000; ANAYA y CRUZ-ORTEGA, 2001). Referido a esto mismo, en estudios previos acerca de la base de resistencia de la cebada a áfidos, CORCUERA (1993), señala que el alcaloide gramina es tóxico a mamíferos, bacterias, hongos fitopatógenos y plantas, lo que se explicaría por sus efectos en el metabolismo energético al inhibir los mecanismos de la foto-fosforilación.

Otro experimento que ha confirmado la existencia de la alelopatía es el trabajo de BAIS *et al.*, (2003) quienes confirman que las plantas de *Centaurea maculosa* Lam., exudan desde sus raíces la sustancia fitotóxica(-)-catequina, a la cual se atribuye la gran capacidad invasora de esa maleza.

2.4.3.1 Exudados radicales. Se denominan exudados radicales a los compuestos químicos secretados en el suelo por las raíces de las plantas, los cuales pueden cumplir importantes roles como atrayentes y repelentes químicos en la rizósfera (estrecha zona de suelo que rodea inmediatamente el sistema radical) (Bais *et al.*, 2001, citado por WALKER *et al.*, 2003). Aunque la definición más común de exudado radical se refiere a las sustancias que son liberadas en el medio circundante por raíces de plantas sanas e intactas, algunos autores distinguen entre exudados y secreciones, siendo los exudados aquellos compuestos liberados pasivamente y las secreciones aquellos compuestos liberados activamente (HENRY, 2003).

Los exudados radicales se han agrupado tradicionalmente en compuestos de bajo y alto peso molecular (TU *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha realizado un estudio sistemático para determinar la complejidad y composición química en diversas especies de plantas. Se cree que los compuestos de bajo peso molecular, comprenden la mayor parte de los exudados radicales, estos incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, y varios otros metabolitos secundarios, mientras que los exudados de alto peso molecular, incluyen los mucílagos (polisacáridos de alto peso molecular) y las proteínas (BAIS *et al.*, 2002b; WALKER *et al.*, 2003; SULLIVAN, 2004). Por su parte, DAKORA y PHILLIPS (2002) señalan que los exudados de las raíces de plantas consisten en una mezcla compleja de ácidos orgánicos, fitosideróforos, azúcares, vitaminas, purinas, nucleótidos, iones inorgánicos (por ejemplo HCO_3^- , OH^- , H^+), moléculas gaseosas (CO_2 , H_2), enzimas y células del borde de las raíces que tienen

importantes efectos directos o indirectos en la adquisición de nutrientes minerales requeridos para el crecimiento de la planta. Algunos de los compuestos detectados en exudados radicales de plántulas de alfalfa han sido el ácido cítrico, málico y succínico (LIPTON *et al.*, 1987).

Según EISSENSTAT y YANAI (1997) los azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos de los exudados radicales son solubles en agua, mientras que las células de la caliptra, mucílago y restos de paredes celulares son insolubles en agua. Los compuestos fenólicos son ubicuos en materiales vegetales y han sido objeto de muchos estudios alelopáticos (INDERJIT, 1996). En relación a los ácidos orgánicos, aquellos que tienen un grupo hidroxilo (-OH) en sus carbonos alfa se llaman α -hidroxiácidos (HUANG *et al.*, 2002), algunos de estos ácidos son el ácido tartárico, málico, láctico y cítrico (MASÁR *et al.*, 2001).

Se ha informado que los ácidos p-hidroxibenzoico, vainíllico, p-cumárico y ferúlico, son todos compuestos alelopáticos comunes en las plantas (Rice, 1987, citado por CHUNG *et al.*, 2001).

Los ácidos fenólicos son compuestos fenólicos de la familia no flavonoide, biosintetizados a través de la vía del ácido shiquímico. Existen dos principales grupos de ácidos fenólicos: los ácidos hidroxibenzoicos y los hidroxicinámicos. Los primeros tienen una estructura general de tipo C_6-C_1 con el anillo benzoico derivado directamente del ácido benzoico y difieren de acuerdo con las hidroxilaciones y metoxilaciones en el anillo aromático. Los ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3) derivan del ácido cinámico (BUDIC-LETO y LOVRIC, 2002). En adición a los conocidos terpenoides volátiles, los compuestos fenólicos tóxicos solubles en agua, tales como los fenoles simples, los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos pueden servir como compuestos alelopáticos (Strack, 1997, citado por HÄKKINEN, 2000).

2.4.3.1.1 Rol de los exudados radicales y mecanismos de liberación. Se sabe que a través de la exudación de una amplia variedad de metabolitos secundarios, las raíces pueden regular la comunidad microbiana del suelo en su vecindad inmediata, manejarse con los herbívoros, estimular simbiosis benéficas, cambiar las propiedades químicas y físicas del suelo e inhibir el crecimiento de especies de plantas competidoras (VIVANCO y BAIS, 2004).

La comprensión de la biología del proceso de exudación radical puede contribuir a idear nuevas estrategias para mejorar las propiedades de la planta y al aislamiento de nuevos compuestos de valor agregado encontrados en los exudados radicales. Aunque la exudación de las raíces representa un costo significativo a la planta, los mecanismos y los procesos regulatorios que controlan la secreción radical sólo recientemente han comenzado a ser examinados (WALKER et al., 2003).

Los exudados radicales a menudo incluyen fenilpropanoides y flavonoides sintetizados presumiblemente en la superficie del citoplasma del retículo endoplasmático (Winkel-Shirley, 2001, citado por WALKER et al., 2003).

2.4.3.1.2 Respuestas de insectos de suelo a los exudados radicales. En general, los estudios del efecto de los exudados radicales sobre otros organismos están circunscritos casi exclusivamente al efecto de ellos sobre otras plantas, existiendo escasa información sobre su efecto en la herbivoría por insectos y esta información es nula para el caso de larvas de escarabeidos. Sin embargo, a continuación se citan algunos ejemplos para confirmar que las raíces exudan compuestos a la rizósfera y éstos pueden afectar las respuestas de otros organismos presentes en el suelo, además de otras plantas. Se ha demostrado que varios aleloquímicos poseen un amplio espectro de actividad. Es el caso de los resultados obtenidos por Wink y

otros con más de 70 alcaloides de donde indican que la mayoría de estos compuestos son tóxicos o inhibidores a más de un grupo de organismos, incluyendo plántulas, bacterias, insectos y mamíferos KRUSE *et al.*, 2000.

EBANA *et al.*, (2001) señalan que existe un efecto alelopático de extractos solubles en agua y que algunas plantas liberan aleloquímicos desde sus raíces. En ensayos recientes, se ha encontrado que el compuesto aleloquímico momilactona B se encuentra presente en los exudados de raíces de arroz, la cual es liberada desde sus raíces al ambiente (KATO-NOGUCHI, 2004). Los exudados radicales producidos por sorgo contienen un compuesto biológicamente activo conocido como sorgoleone (CZARNOTA *et al.*, 2001), el cual actuaría como inhibidor mitótico sobre otras plantas (HALLAK *et al.*, 1999).

Elad y Baker (1985) y Elad y Chet (1987), citados por AZIZ *et al.*, (1997) informaron que las fuentes de carbono suministradas ya sea por sustancias sintéticas o excretadas por las raíces de plantas podrían estar involucrados en la germinación de clamidosporas y oosporas de *Fusarium oxysporum* Schlecht y *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. respectivamente. Por otra parte, se ha señalado que los exudados radicales y los componentes químicos de la rizósfera pueden estimular la eclosión de huevos de nemátodos y actuar como estímulo para la orientación de juveniles hacia las raíces. Por ejemplo, los extractos de raíces de cucurbitáceas contienen compuestos que actúan como atrayentes y repelentes a juveniles de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White)(CASTRO *et al.*, 1990), y altas concentraciones de sales, incluyendo las sales de la solución de Hoagland pueden ser repelentes a juveniles de *Meloidogyne javanica* (Treub)(Prot, 1978, citado por CASWELL *et al.*, 1991).

Un ejemplo de estudios con insectos es el experimento realizado por SAXENA *et al.*, (1999) en el cual demostraron que las toxinas Bt son liberadas en el suelo de la rizósfera en el

exudado de las raíces desde maíz Bt. Por otro lado, BAIS *et al.*, (2002a), informaron la presencia de dos alcaloides β -carbolina en los exudados radicales de *Oxalis tuberosa* Mol., denominados como harmina (7-metoxi-1-metil- β -carbolina) y harmalina (3,4-dihidroharmina). Estos exhiben una fuerte toxicidad contra *Trichoplusia ni* (Hübner), y esta actividad insecticida estaría ligada a su fotoactivación (Larson *et al.*, 1988, citado por WALKER *et al.*, (2003). Estos investigadores sugieren que la luz ultravioleta que penetra al suelo podría fotoactivar los alcaloides β -carbolina secretados por las raíces de oca para crear una respuesta de defensa insecticida.

2.5 Relaciones entre larvas de escarabeidos, raíces y materia orgánica.

La materia orgánica del suelo tiene una composición muy compleja y heterogénea y está generalmente mezclada o asociada con los constituyentes minerales del suelo para formar los agregados del suelo (Delgado *et al.*, 2003, citado por HUYGENS *et al.*, 2005). Está constituida por los residuos de plantas y animales en diferentes estados de descomposición y la masa microbiana y se relaciona estrechamente con la propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (ZAGAL y CÓRDOBA, 2005).

La materia orgánica del suelo a menudo se divide en materiales humificados y no humificados. Las sustancias no humificadas son los compuestos de plantas y otros organismos tales como carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y ligninas. Estos compuestos están usualmente sujetos a reacciones de descomposición y degradación y algunas veces pueden ser adsorbidos por los componentes inorgánicos del suelo, tales como las arcillas. La fracción humificada se conoce como compuestos húmicos o materia húmica (TAN, 1998). Con la humificación, los residuos de plantas son transformadas en

formas más estables (humus) a través de procesos físicos, químicos y biológicos (CHEFETZ *et al.*, 2002).

Algunos autores asignan una mayor recalcitrancia a aquellas materias orgánicas en que predomina el humus, siendo la recalcitrancia el nivel de resistencia de una molécula a la ruptura microbiana y enzimática (HUYGENS *et al.*, 2005).

Según ZUNINO y BORIE (1985), la materia orgánica estabilizada del suelo o humus constituye aproximadamente el 85% del total de la materia orgánica y el humus puede ser separado en tres fracciones principales según la solubilidad en ácidos o álcalis: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas. Las huminas no son solubles en álcalis ni en ácidos diluidos (0,1 a 0,5N), los ácidos húmicos son solubles en álcalis pero precipitan con ácidos (pH 1,0 a 2,0) y los ácidos fúlvicos son solubles tanto en álcalis como en ácidos. Stevenson, 1994, citado por LI y BRUNE (2005) indica que el humus está compuesto por tres componentes alimenticios principales: 1) polímeros residuales derivados desde los restos vegetales lignocelulósicos, 2) biomasa microbiana de hongos saprófitos y bacterias, y 3) materia orgánica del suelo en diferentes estados de descomposición

En suelos volcánicos se ha encontrado que los residuos derivados de celulosa y lignina son más fuertemente estabilizados por el alofán que la glucosa, lo que dificulta su descomposición por microorganismos (ZAGAL *et al.*, 2002). Como las arcillas minerales están estrechamente asociadas con componentes de la materia orgánica, se pueden formar complejos estables metal-humus-arcilla (HUYGENS *et al.*, 2005).

La localización de los residuos también afecta la tasa de descomposición y se ha observado que los residuos incorporados están sometidos a temperaturas y humedades más homogéneas que residuos sin incorporar al suelo y están en íntimo contacto con los microorganismos, lo que lleva a una rápida descomposición, aunque esto puede ser durante un periodo inicial relativamente

corto (ZAGAL et al., 2002). El máximo crecimiento y actividad de los microorganismos ocurre en el rango de temperatura de 20-40°C, lo que coincide con las tasas máximas de descomposición de la materia orgánica (ZAGAL et al., 2002).

La materia orgánica del suelo usualmente es de bajo valor nutritivo, por lo que la macrofauna del suelo requiere ingerir grandes cantidades para compensar este déficit. Sus principales componentes son los polímeros estructurales celulosa, hemicelulosa y lignina, además de otros componentes menores como proteínas, lípidos, almidón y pectinas (ZHANG et al., 1993).

RITCHER (1958) informó que las larvas de Melolonthinae se alimentan de humus y tejido de plantas vivas. DAVIDSON (1969), indicó que las larvas de escarabeidos incrementaban su peso al aumentar la materia orgánica del suelo y que el daño a plantas forrajeras era disminuido al agregar materia orgánica en forma de estiércol al suelo. Por su parte, KAIN y ATKINSON (1977) señalaron que no estaba claro si el menor daño producido a plantas forrajeras por parte de larvas de escarabeidos era producto del estímulo que el estiércol producía en el crecimiento de las plantas o si el estiércol en sí era una fuente alimenticia para las larvas.

Según Miller citado por SUTHERLAND (1971) las larvas de escarabeidos pueden ser criadas sobre humus en ausencia de material vivo, mientras que RADCLIFFE (1970) observó que al agregar materia orgánica en forma de estiércol de vacuno ocurría menor daño a la planta. KAIN Y ATKINSON (1977), sugieren que las larvas son altamente selectivas en sus hábitos alimenticios, pero que pueden existir sobre materia orgánica en ausencia de tejido vivo.

Las larvas de *Sericesthis nigrolineata* Boisduval ingirieron selectivamente la materia orgánica del suelo y cuando se criaron en raíces vivas en el suelo las larvas mostraron un incremento en la proporción de materia orgánica en sus intestinos

anteriores, así como en la cantidad de materia orgánica asimilada y en el crecimiento larval (RIDS DILL SMITH, 1975; RIDS DILL SMITH y ROBERTS, 1976).

RIDS DILL SMITH, (1975) señala que si bien muchas especies de escarabeidos pueden alimentarse tanto de materia orgánica como de raíces de plantas vivas, su habilidad para seleccionar una en lugar de otra es poco entendida. Según este autor, cuando las raíces vivas no estaban presentes, las larvas fueron capaces de alimentarse y crecer a una tasa reducida por largos periodos de tiempo sobre la materia orgánica muerta. El mismo estudio señala que cuando las larvas de *S. nigrolineata* se mantuvieron en un suelo Ebor de una pradera mejorada sin plantas, con un contenido de 17-18% de materia orgánica, ellas no ingirieron tanto material y no crecieron tan bien como las larvas que se habían alimentado de un suelo Chiswick de una empastada nativa que contenía sólo un 3-4% de materia orgánica, por lo tanto, no encontró evidencia de que el mayor contenido de materia orgánica en el suelo Ebor permitiera crecer mejor a las larvas. El mismo autor señala que la calidad o tipo de materia orgánica, posiblemente relacionada con la actividad microbiana, puede ser más importante que la cantidad de materia orgánica presente en el suelo.

Los estudios actuales han revelado que las larvas de escarabeidos se caracterizan por la presencia de un intestino medio fuertemente alcalino con actividad de enzimas hidrolíticas y un intestino posterior con procesos de fermentación microbiana. El alto pH intestinal facilitaría la desorción de sustancias húmicas desde la matriz mineral dejando accesible los compuestos orgánicos a la digestión enzimática (LEMKE et al., 2003; JI y BRUNE, 2004).

Se ha encontrado altas concentraciones de productos de fermentación microbiana y una comunidad microbiana diversa tanto en el intestino medio como en el posterior del escarabajo humívoro de la subfamilia cetoniinae *Pachnoda ehippiata*

Gerstaecker; las actinobacterias dominan el intestino medio más alcalino, en tanto que en el intestino posterior dominan los miembros del Phylum CFB (Cytophaga\Flavobacter\Bacteroides) EGERT *et al.*, (2003).

LI y BRUNE (2005a,b) demostraron experimentalmente que las larvas de *P. ehippiata* pueden usar no sólo la celulosa, sino también la biomasa bacteriana y fúngica y sus componentes, tales como, proteínas, peptidoglicanos y quitina, como fuente de nutrientes y energía. Además, ellos indican que la utilización de esta masa microbiana y sus componentes estructurales compensan la deficiencia de nitrógeno inherente a una dieta puramente fibrosa. Otros estudios, en la misma especie *P. ehippiata*, usada como modelo, LI y BRUNE (2004) han demostrado que estas larvas húmívoras digieren selectivamente los péptidos y polisacáridos de las sustancias húmicas mientras que sus componentes aromáticos no constituyen una fuente importante de nutrientes y energía.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Respuesta de larvas de *Hylamorpha elegans* y *Phytoloema herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses.

Se realizaron cuatro experimentos en invernadero, para determinar el efecto de los exudados radicales de especies forrajeras sobre la variación de peso y sobrevivencia de larvas de tercer estadio de ambas especies de escarabeidos. El primer experimento midió la respuesta de 6 larvas de tercer estadio de *H.elegans* al riego con agua percolada de 10 plantas por macetero de cuatro especies forrajeras más un tratamiento con agua percolada desde macetas con suelo sin plantas. El segundo experimento midió la respuesta de 10 larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* al riego con agua percolada de las mismas especies forrajeras establecidas para el experimento 1, más un tratamiento de riego con el agua percolada de un suelo sin plantas y un tratamiento de riego con agua destilada. El tercer y cuarto experimento evaluaron la respuesta de larvas de *P.herrmanni* mantenidas individualmente en suelo y arena al riego con el agua percolada obtenida desde maceteros con plantas de las especies forrajeras en estudio cultivadas hidropónicamente en arena y en lana de vidrio. La utilización de larvas individuales en este tipo de experimentos ha sido considerada una metodología adecuada en ensayos de resistencia de especies forrajeras a larvas de escarabeidos (GAYNOR et al., 1986; VAN DEN BOSCH et al., 1995). Los cuatro experimentos fueron complementados con el análisis químico de los exudados lixiviados desde las raíces de las diferentes especies forrajeras en los distintos tratamientos en tres fechas de colecta.

3.1.1 Materiales utilizados en los experimentos. Los materiales utilizados en los diferentes experimentos fueron los que se indican a continuación.

3.1.1.1 Ubicación de los ensayos. Todos los experimentos fueron realizados en el invernadero del Programa de Certificación de Semillas del Laboratorio Regional Osorno del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), ubicado a 3 Km al este de la ciudad de Osorno, ubicada en los 40° 36' de latitud sur, con 73° 4' de longitud oeste, en la Décima región de Chile.

3.1.1.2 Características de las parcelas. Cada parcela en los experimentos 1 y 2 consistió en maceteros de polietileno de alta densidad de 25 cm de diámetro superior, 18 cm de diámetro inferior y 26 cm de altura, mientras que para los experimentos 3 y 4 cada parcela consistió en maceteros de polietileno de alta densidad de 10 cm de diámetro superior, 7 cm de diámetro inferior y 10 cm de altura.

3.1.1.3 Características de los sustratos. Para los experimentos 1 y 2 se utilizó como sustrato una mezcla de suelo y arena en proporción 1:1 (v/v). El suelo correspondió a un tipo trumao obtenido de la Estación de Prueba del Laboratorio Regional SAG Osorno de un lugar no sometido a prácticas agrícolas en los últimos cinco años y la arena fue proveniente de río. El suelo es de la clase Andisoles y se caracteriza por ser de origen volcánico, dominado por alófanos o complejos Al-húmicos, generalmente ricos en materia orgánica (SCHLATER *et al.*, 2003). Posee un amplio horizonte A que puede alcanzar 80 ó más cm de espesor y su contenido de C orgánico que varía usualmente entre 12-16% (BESOAIN, 1985). Contiene grandes cantidades de alofán, un silicato de aluminio amorfo, junto con minerales secundarios semejantes al alofán y óxidos de fierro y aluminio BORIE y

RUBIO, 2003) y posee una alta capacidad de retención de fósforo (BONOMELLI *et al.*, 2003; BORIE y RUBIO, 2003)

Para los experimentos 3 y 4, se utilizaron dos sustratos distintos: arena de río y lana de vidrio respectivamente. La realización de estos experimentos estuvo basada en que varios estudios han demostrado que la absorción de los compuestos fenólicos aumenta linealmente con el aumento de los niveles de materia orgánica en el suelo. De esa forma, en la medida que aumenta el contenido de materia orgánica hay una mayor absorción de los compuestos liberados desde residuos los cuales disminuirían el nivel de respuesta observada en los ensayos (OHNO y DOOLAN, 2001). Debido a lo anterior estos investigadores usaron arena para permitir la determinación de los efectos de fitotoxicidad sin ser confundidos por los efectos de la absorción del suelo por la materia orgánica. Al respecto, HENRY (2003) señala que la lana de vidrio provee condiciones de crecimiento óptimas para un sistema de cultivo axénico. La misma autora agrega que la arena es similar a la lana de vidrio pero menos costosa y tiene menor superficie reactiva que el suelo o la arcilla semicalcinada y que la arena como medio de crecimiento permite la remoción completa de la solución de la zona radical sin adsorción de los compuestos.

3.1.1.4. Material biológico. El material biológico utilizado en el experimento 1 consistió en 300 larvas de tercer estadio de *H. elegans* y 40 plantas de cuatro especies forrajeras: *Lolium perenne* L. cv. Napoleón, *Medicago sativa* L. cv. California, *Trifolium repens* L. cv. Huia y *Trifolium subterraneum* L. cv. Denmark. Tanto *L. perenne* como *T. repens* constituyen importantes componentes de las praderas de la zona sur de Chile y el cultivar Napoleón de ballica se eligió en base a su ausencia de endófito, para evitar alguna interferencia de este factor (KOPPENHÖFER *et al.*, 2003) en los ensayos. En el caso de *T. subterraneum*, esta especie fue poco afectada en estudios previos

(ROJAS, 1994) y en el caso de *M. sativa*, algunos ensayos preliminares sugieren que sus exudados pudieran tener algún efecto detrimental sobre larvas de escarabeidos nativos*.

El material biológico utilizado en el experimento 2 consistió en 600 larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* y las mismas 40 plantas de las cuatro especies forrajeras utilizadas en el experimento 1. El material biológico para el experimento 3 y 4 fueron 30 y 42 larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* respectivamente y 5 plantas de las cuatro especies forrajeras utilizadas en los experimentos 1 y 2 por cada tratamiento en que se utilizaron los exudados provenientes de estas plantas.

Las plantas para todos los experimentos fueron obtenidas a partir de semillas proporcionadas por Agrícola Nacional SACI y el Laboratorio de Semillas del Servicio Agrícola y Ganadero, Osorno, Décima Región.

3.1.1.5 Fertilizantes. Los fertilizantes aplicados al sustrato al inicio del experimento 1 fueron salitre sódico, superfosfato triple y sulfato de potasio, mientras que en el caso del experimento 3, la fertilización fue realizada mediante el riego con solución completa de Hoagland.

3.1.1.6 Otros materiales. Para los distintos experimentos en invernadero fueron necesarios otros materiales e instrumentos, tales como, agua destilada, pizetas, pipetas, propipeta automática, probetas, tubos de ensayo, tamices, palas, frascos de vidrio, bolsas de polietileno, balanza analítica, etiquetas, pinzas, gradillas.

*Carrillo, R. 2003. Ing. Agr., M.Sc., Ph.D. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia. Comunicación personal

3.1.2 Métodos utilizados en los experimentos. A continuación se indican los métodos utilizados en los diferentes ensayos. Estos métodos fueron similares en los experimentos 1 y 2, con las diferencias que se detallan en cada uno de ellos.

3.1.2.1 Duración de los experimentos. En el experimento 1, las semillas de las especies forrajeras fueron sembradas el 30 de enero de 2004. La incorporación de las larvas de tercer estadio de *H. elegans* a las parcelas respectivas en suelo sin plantas fue realizada el 20 de marzo, a partir de esta fecha se dio inicio al riego con los exudados en cada uno de los tratamientos. La cosecha y evaluación de las larvas de este experimento fue realizada el 20 de abril de 2004.

En el experimento 2, se utilizaron las mismas plantas establecidas para el experimento 1. La incorporación de las larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* a las parcelas respectivas en suelo sin plantas fue realizada el 12 de mayo y las evaluaciones de este experimento fueron realizadas en tres fechas : 12 de junio, 12 de julio y 6 de septiembre de 2004.

En los experimentos 3 y 4, las semillas fueron sembradas el 30 de enero de 2004. La incorporación de las larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* a las parcelas respectivas en suelo sin plantas y arena sin plantas fue realizada el 3 de mayo e incluyó 4 fechas de evaluaciones, éstas fueron el 3 de junio, 23 de junio, 12 de julio y 12 de agosto del mismo año 2004.

3.1.2.2 Preparación de los sustratos. Para el establecimiento de las especies forrajeras de los experimentos 1 y 2 se utilizó suelo y arena tamizados con harneros de 9 mesh, para eliminar restos de vegetales e insectos presentes en el sustrato. Posteriormente, ambos sustratos fueron transportados al invernadero donde se mezclaron en partes iguales en volumen de suelo con arena (1:1), con el propósito de obtener una mayor capacidad de lixiviación de los exudados liberados por las

raíces de las diferentes especies forrajeras, mientras que para el establecimiento de las parcelas con las larvas del experimento 1 y 2 se utilizó como sustrato solamente suelo tamizado, para simular de manera más precisa las condiciones naturales del suelo en que habitan las larvas de los escarabeidos estudiados. En los experimentos 3 y 4, en cambio, para el establecimiento de las parcelas con larvas se utilizó arena limpia, la cual fue lavada primero con agua corriente y posteriormente enjuagada con agua destilada.

3.1.2.3 Establecimiento de las parcelas. Para la obtención de las plantas del experimento 1, las cuales fueron posteriormente utilizadas en el experimento 2, el 30 de enero de 2004, se sembraron 50 semillas por macetero de cada especie forrajera, dejando 10 plantas por cada macetero, el 5 de marzo del mismo año, totalizando 10 maceteros por cada una de las cuatro especies forrajeras, más 10 maceteros con suelo sin plantas. Para el establecimiento de las parcelas con larvas de este experimento, se utilizó un total de 50 maceteros, conteniendo cada uno de ellos 6 larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo sin plantas.

En el experimento 2, se utilizaron las mismas plantas establecidas en el experimento 1 y para el establecimiento de las parcelas con larvas de este experimento se utilizaron 60 maceteros conteniendo cada uno 10 larvas de tercer estadio de *P. herrmanni*.

En los experimentos 3 y 4 se dejaron cinco plantas por macetero el 15 de febrero de 2004 en la totalidad de las parcelas con especies forrajeras en ambos sustratos.

Los tratamientos utilizados para el caso del estudio de la respuesta a lixiviados desde plantas en arena como sustrato (experimento 3) fueron los siguientes:

AAARAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de alfalfa cultivadas en arena.

TSARAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de trébol subterráneo cultivadas en arena.

TBARAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de trébol blanco cultivadas en arena.

BIARAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de ballica inglesa cultivadas en arena.

ARAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con arena.

Por otro lado, realizado en forma simultánea, los tratamientos utilizados para medir la respuesta a los exudados contenidos en la solución percolada desde plantas cultivadas en lana de vidrio como sustrato (experimento 4) fueron los siguientes:

AALVAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de alfalfa cultivadas en lana de vidrio.

TSLVAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de trébol subterráneo cultivadas en lana de vidrio.

TBLVAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de trébol blanco cultivadas en lana de vidrio.

BILVAR: Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con plantas de ballica inglesa cultivadas en lana de vidrio.

LVAR : Una larva en una maceta con arena regada con el agua percolada desde una maceta con lana de vidrio sin plantas.

SU : Una larva en una maceta con suelo sin plantas regada con agua destilada.

SUSU : Una larva en una maceta con suelo sin plantas regada con el agua percolada desde una maceta con suelo sin plantas.

3.1.2.4 Fertilización. Se utilizó una fertilización a la siembra de las especies forrajeras equivalente a 60 U de N/ha como salitre sódico, 200 U de P_2O_5 /ha a la forma de superfosfato triple y 80 U de K_2O /ha como sulfato de potasio. Con esta fertilización se obtuvo un buen desarrollo de todas las especies forrajeras en estudio, durante todo el periodo de cultivo para los experimentos 1 y 2. Para los tratamientos en las parcelas de suelo con larvas no recibieron aplicación de fertilizantes en ninguno de los experimentos, eliminando de esa forma el posible efecto directo de los fertilizantes sobre las larvas.

3.1.2.5 Riego y control de malezas. En los experimentos 1 y 2, el control de malezas se realizó en forma manual diariamente, eliminando toda especie vegetal que no correspondía a las

especies en estudio en los tratamientos con plantas e impidiendo el desarrollo de cualquier especie vegetal en los suelos sin cubierta vegetal con larvas. El riego a las especies forrajeras y sustratos sin vegetación consistió en la aplicación de 1000 ml de agua destilada semanalmente para permitir la obtención de aproximadamente 500 ml de agua percolada en bandejas de polietileno de alta densidad colocadas debajo de los maceteros, para ser aplicada a suelo sin vegetación con larvas de acuerdo a los distintos tratamientos. En los experimentos 3 y 4 se aplicaron 10 ml de solución completa de Hoagland cada dos días en la totalidad de las parcelas con plantas, a partir de los 10 días posteriores a la germinación. En este mismo experimento, tanto los tratamientos con plantas como los con sustratos sin plantas fueron regados con agua destilada suficiente para obtener 100 ml de agua percolada en bandejas de polietileno de alta densidad colocadas debajo de cada macetero. El líquido así obtenido fue aplicado a los maceteros correspondientes que contenían una larva de tercer estadio de *P. herrmanni*.

3.1.2.6 Colecta, selección e incorporación de las larvas en las parcelas. Tanto las larvas de tercer estadio de *H. elegans* como las de *P. herrmanni*, fueron colectadas en una pradera mixta de la Estación Experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile y mantenidas individualmente en frascos pequeños de tereftalano de polietileno (2 cm de diámetro superior e inferior y 3 cm de altura). Las larvas fueron cubiertas con suelo y trasladadas al Laboratorio Regional SAG Osorno para su selección, pesaje e incorporación a los maceteros. En el laboratorio, las larvas fueron mantenidas en sus frascos individuales durante 24 horas, eliminando las que estaban enfermas, dañadas o presentaban un tamaño muy diferente y se descartaron aquellas que no correspondían a la especie. En los experimentos 1, 2, 3 y 4 se incluyeron 6, 10, 1 y 1 larva por maceta respectivamente. Estas larvas fueron previamente pesadas

e incorporadas a los maceteros debidamente identificados, los cuales fueron regados con el agua percolada desde las plantas o del sustrato sin vegetación.

3.1.3 Evaluaciones. Las evaluaciones del experimento 1 fueron realizadas al mes siguiente de ser agregadas las larvas a los maceteros. Para ello, cada macetero fue llevado a la sala de crianza del Laboratorio SAG Osorno, allí, el suelo de los maceteros conteniendo las 6 larvas, fue esparcido cuidadosamente sobre un mesón cubierto con plástico para extraer las larvas. Estas larvas fueron colocadas individualmente en tubos de ensayo, evitando la luz directa, identificándolas y llevándolas de inmediato al laboratorio para ser registradas y pesadas a las 24 horas de haber sido colectadas en una balanza analítica. En el experimento 2, la metodología fue similar a la utilizada en el experimento 1, pero en este caso, una vez pesadas, las larvas fueron devueltas al mismo macetero desde donde se habían extraído haciendo orificios de cinco centímetros de profundidad y transportadas en sus maceteros al invernadero, para una posterior evaluación al siguiente mes. Este experimento fue finalizado el 6 de septiembre momento en que se observó el primer individuo adulto, la idea inicial era determinar la respuesta con relación a la formación de pupas, pero como se muestra en la presentación y discusión de este experimento se obtuvo tanto larvas pupas y adultos, las cuales fueron evaluadas en el total de insectos recuperados y por cada uno de los estados de desarrollo.

En los experimentos 3 y 4, las larvas de cada macetero en los distintos sustratos fueron extraídas en distintas fechas para determinar la sobrevivencia larval y su variación de peso, pesándolas individualmente en una balanza analítica y devueltas al sustrato correspondiente en forma similar al experimento 2.

3.1.4 Obtención de exudados para análisis. Las fechas de colecta de exudados para los correspondientes análisis fueron el 17 de marzo, 20 de abril y 23 de julio. Para la obtención de los exudados, en la totalidad de los experimentos, después de 2 horas de haber realizado el riego a los maceteros, se colectaron con una propipeta automática, aproximadamente 10 ml de agua percolada obtenida individualmente desde las bandejas plásticas dispuestas bajo cada macetero. Posteriormente tomando en consideración la totalidad de maceteros de cada tratamiento, se procedió a juntar el agua percolada de la mitad de los maceteros, obteniendo así dos repeticiones por cada uno de los tratamientos. Posteriormente, los líquidos fueron filtrados con filtros miliporo de 2 μ m, obteniendo un volumen final de 20 ml por cada repetición, el cual fue alicuotado en tubos Eppendorf y mantenido a -20°C hasta su análisis en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. La filtración del agua percolada tuvo como objetivo remover la biomasa microbiana, de tal forma que la concentración de carbono orgánico disuelto reflejara sólo el carbono orgánico soluble en agua, tal como lo señalan OHNO y DOOLAN (2001).

3.1.4.1 Preparación de las muestras para análisis. Se analizó en los líquidos percolados, los exudados solubles del tipo fenoles, hidratos de carbono e hidroxiácidos. En forma previa a todos los análisis fue necesario concentrar estos líquidos mediante liofilización. Para este propósito, las muestras de agua percolada de cada repetición (mantenidas a -20°C) fueron descongeladas, dispensando 15 ml en un tubo Falcon estéril de 50 ml de capacidad. Cada tubo fue tapado con una lámina de aluminio, realizando un pequeño orificio en el centro de la cubierta y congelado a -20°C para su posterior liofilización. Una vez realizado este procedimiento, los tubos fueron colocados en gradillas plásticas al interior de un liofilizador Labconco

Lyph-Lock 12 durante 24 hrs. Al término de este período el residuo obtenido en cada uno de los tubos fue resuspendido en 5 ml de agua bidestilada estéril, agitado vigorosamente y alicuotado en tubos Eppendorf. Estos tubos fueron mantenidos congelados a -20 °C hasta el momento del análisis respectivo.

3.1.4.2 Determinación de fenoles solubles totales. Para la determinación de la concentración de los compuestos fenólicos totales contenidos en el agua percolada de las dos repeticiones de cada tratamiento, se usó una adaptación del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Box, 1983, citado por OHNO y DOOLAN (2001). A un tubo de ensayo de 5 ml de capacidad se agregaron 250 µL de muestra, luego se agregó 1,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:10. Esta mezcla fue agitada e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregó a la mezcla 1 mL de Na₂CO₃ al 7,5 % y se agitó vigorosamente. La reacción fue dejada en incubación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente se leyó su absorbancia a 740 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 3000 Array utilizando agua destilada como testigo. Se utilizó ácido gálico para generar la curva estándar con concentraciones desde 2 a 20 ppm y las concentraciones de fenoles totales fueron expresadas en unidades equivalentes de ácido gálico.

3.1.4.3 Determinación de azúcares solubles totales. La determinación de los azúcares totales fue realizada mediante el método colorimétrico de la antrona (DUBOIS *et al.*, 1956; WANG *et al.*, 2002). En un tubo de ensayo de 5 ml de capacidad se colocó 1 ml del reactivo antrona (9(10H)-antraceno; 9,10-dihidro-9-oxoantraceno), luego se agregó 500 µL de muestra. Simultáneamente, los tubos fueron depositados en vasos de acero inoxidable con hielo en su interior. Una vez que los tubos estaban fríos se agitaron en un vortex por aproximadamente 20

segundos. Luego se llevaron a baño María durante 15 min, se dejaron enfriar durante una hora y se leyó la absorbancia a 625 nm en el espectrofotómetro Milton Roy. A los testigos sólo se agregó 500 µl de agua destilada

3.1.4.4 Determinación de ácidos orgánicos solubles. Mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RPLC) se analizó el contenido, en los líquidos percolados, de ácido cítrico, fumárico, málico, malónico y succínico, según la metodología propuesta por CAWTHRAY (2003). La separación fue realizada en una columna Alltima C18 (250 mm X 4.6 mm, I.D.) con un tamaño de partícula de 5 µm. Todos los datos fueron procesados con el software Star Chromatography Workstation versión 5.3. La absorbancia se leyó en un detector UV- VIS Merck Hitachi modelo L- 4250 programado a 210 nm. La fase móvil consistió en 70% 25 mM de KH_2PO_4 ajustado a pH 2,5 con ácido ortofosfórico concentrado y 7% metanol a una tasa de flujo de 0,5 ml/min con la bomba Merck Hitachi modelo L-6200A. La separación se realizó a temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y las inyecciones se realizaron con el inyector automático (autosampler) Merck Hitachi modelo L- 7200. A la totalidad de las muestras y estándares se adicionó 20 µL de HCl 0,5 N.

La presencia de los ácidos orgánicos fueron identificados por sus tiempos de retención con los estándares. Las concentraciones fueron calculadas mediante la comparación de las áreas de los picos de las muestras con aquellas de los estándares.

Para la presentación de los resultados de los distintos tratamientos se han usado siglas que deben ser interpretadas como se indica a continuación:

SUAL: agua percolada desde suelo con alfalfa, aplicada a suelo con larvas.

SUTS: agua percolada desde suelo con trébol subterráneo, aplicada a suelo con larvas.

SUTB: agua percolada desde suelo con trébol blanco, aplicada a suelo con larvas.

SUBI: agua percolada desde suelo con ballica inglesa, aplicada a suelo con larvas.

SUSU1: agua percolada desde suelo sin plantas, aplicada a suelo con larvas

ARAL: agua percolada desde arena con alfalfa, aplicada a arena con larvas.

ARTS: agua percolada desde arena con trébol subterráneo, aplicada a arena con larvas.

ARTB: agua percolada desde arena con trébol blanco, aplicada a suelo con larvas.

ARBI: agua percolada desde arena con ballica inglesa, aplicada a arena con larvas.

ARAR: agua percolada desde arena desnuda, aplicada a arena con larvas.

SUSU2: agua percolada desde suelo sin plantas, aplicada a suelo con larvas

LVAL: agua percolada desde lana de vidrio con alfalfa, aplicada a arena con larvas.

LVTS: agua percolada desde lana de vidrio con trébol subterráneo, aplicada a arena con larvas.

LVTB: agua percolada desde lana de vidrio con trébol blanco, aplicada a arena con larvas.

LVBI: agua percolada desde lana de vidrio con ballica inglesa, aplicada a arena con larvas.

LVAR: agua percolada desde lana de vidrio desnuda, aplicada a arena con larvas.

3.2 Respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a la presencia de raíces de distintas especies forrajeras y una enmienda orgánica al suelo.

Se realizaron dos experimentos (experimento 5 y 6) en invernadero, para determinar la sobrevivencia y variación de peso de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni*, a fin de dilucidar el rol que juegan las raíces de diferentes especies forrajeras y una enmienda orgánica en su crecimiento y desarrollo, en comparación a un suelo sin plantas. Se utilizaron larvas de segundo estadio para tener un período de evaluación prolongado.

3.2.1 Materiales utilizados en los experimentos. Los materiales utilizados en los experimentos 5 y 6 fueron similares a los utilizados a los experimentos de exudados.

3.2.1.1 Ubicación de los ensayos y características de las parcelas. Ambos ensayos fueron ubicados en el mismo invernadero del Laboratorio Regional SAG Osorno. Para el caso del experimento 5 se utilizaron macetas iguales a las usadas en el experimento 1 y 2, mientras que para el experimento 6 se utilizaron macetas iguales a las de los experimentos 3 y 4.

3.2.1.2 Material biológico. El material biológico utilizado en el experimento 5 consistió en 600 larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* y 10 plantas por macetero, obtenidas a los 15 días después de la siembra, de las cuatro especies forrajeras: *Lolium perenne* L. cv. Napoleon, *Medicago sativa* L. cv. California, *Trifolium repens* L. cv. Huia y *Trifolium subterraneum* L. cv. Denmark.

El material biológico para el experimento 6 consistió en 108 larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* y 5 plantas por macetero de las cuatro especies forrajeras utilizadas en los demás ensayos. Estas 5 plantas definitivas fueron dejadas a los

15 días después de su siembra. Se utilizaron las mismas semillas, fertilizantes y otros materiales necesarios detallados en los experimentos 1 y 2.

3.2.2 Métodos utilizados en los experimentos. Los métodos utilizados en los experimentos 5 y 6 fueron los siguientes.

3.2.2.1 Duración de los experimentos. El experimento 5 tuvo una duración de 107 días, desde el 25 de febrero hasta el 10 de junio de 2005. El experimento 6 tuvo una duración de 78 días, desde el 23 de febrero al 15 de mayo del mismo año.

3.2.2.2 Preparación de los sustratos. En ambos experimentos se usó un suelo tamizado obtenido del mismo lugar en que había sido obtenido para los experimentos anteriores. Tanto en el experimento 5 como en el 6 se agregó un tratamiento con suelo sin plantas y una mezcla de estiércol maduro de ovinos de un año, obtenido desde la pradera circundante al Laboratorio Regional SAG Osorno, con suelo en proporciones iguales en volumen suelo/estiércol 1:1.

3.2.2.3 Establecimiento de las parcelas. En ambos experimentos la siembra de las semillas de las especies forrajeras se realizó el mismo día en que se agregaron las larvas a las parcelas correspondientes. En el experimento 5 se sembraron 50 semillas por macetero de cada especie forrajera para dejar, al cabo de 15 días, 10 plantas de cada especie. En el experimento 6 se sembraron 20 semillas para dejar, al cabo de 15 días, cinco plantas de cada especie por cada parcela.

3.2.2.4 Fertilización. En ambos experimentos se usó una fertilización al momento de la siembra en la totalidad de las parcelas, equivalente a 60 U de N/ha como salitre sódico, 200 U

de P_2O_5 /ha en la forma de superfosfato triple y 80 U de K_2O /ha como sulfato de potasio.

3.2.2.5 Riego y control de malezas. Estas labores culturales se realizaron en forma manual, considerando la mantención de una humedad uniforme en los sustratos y eliminando diariamente las malezas.

3.2.2.6 Colecta, selección e incorporación de las larvas en las parcelas. Las larvas de segundo estadio de *P. herrmanni*, fueron colectadas, transportadas, mantenidas y seleccionadas de forma similar a lo efectuado en los experimentos anteriores. En el experimento 5 se incluyeron 10 larvas por maceta, mientras que en el experimento 6 se incluyó una única larva por maceta.

3.2.3 Evaluaciones. El procedimiento para la obtención de las larvas, para evaluar su sobrevivencia y variación de peso en ambos experimentos, fue igual al empleado en experimentos anteriores.

3.3 Diseño experimental de los ensayos. En el experimento 1 se utilizó un diseño totalmente al azar con cinco tratamientos y 10 repeticiones (los tratamientos fueron las cuatro especies forrajeras más un tratamiento correspondiente a suelo sin plantas).

En el experimento 2 se utilizó un diseño totalmente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones (los tratamientos fueron las cuatro especies forrajeras más un tratamiento de suelo sin plantas y un testigo regado con 500 ml de agua destilada). En el caso de encontrar diferencias significativas en cualquiera de los experimentos, estos análisis de varianza fueron sometidos a la prueba de hipótesis específica de Tukey al 5% NS.

En los experimentos 3 y 4 se utilizaron 5 y 7 tratamientos respectivamente, para los cuales se aplicó un diseño totalmente al azar, con los tratamientos detallados en el punto 3.2.3.

En el experimento 5 se utilizó un diseño totalmente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones (los tratamientos fueron las cuatro especies forrajeras más un tratamiento con suelo sin plantas y mezcla suelo/estiércol 1:1).

En el experimento 6 se utilizó un diseño totalmente al azar con seis tratamientos y 3 repeticiones (los tratamientos fueron las cuatro especies forrajeras más un tratamiento con suelo sin plantas y mezcla suelo/estiércol 1:1). Cada repetición consistió en seis macetas conteniendo cada una de ellas una larva.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presentación y discusión de resultados de los distintos experimentos desarrollada a continuación, se ha ordenado por experimentos. Así, en primer lugar se presentan y discuten los resultados obtenidos en el experimento 1 destinado a medir la respuesta de larvas de *H. elegans* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de distintas especies pratenses (*M. sativa*, *T. subterraneum*, *T. repens* y *L. perenne*) y la respuesta de estas larvas al riego con solución percolada desde un suelo sin plantas. En segundo lugar se presentan y discuten los resultados obtenidos en el experimento 2 destinado a medir la respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de las mismas especies pratenses utilizadas en el experimento 1 y la respuesta de estas larvas al riego con la solución percolada desde un suelo sin plantas y al riego con agua destilada. Considerando que al concluir el experimento 2 se obtuvieron larvas, pupas y adultos de *P. herrmanni* estos resultados fueron evaluados en su totalidad y para cada uno de los estados de desarrollo alcanzado por los insectos. Posteriormente, se presentan y discuten los resultados obtenidos en el experimento 3 y 4 en los cuales se midió la respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de las diferentes especies pratenses utilizadas en los experimentos anteriores; pero en este caso, las plantas fueron desarrolladas en forma hidropónica tanto en arena limpia como en lana de vidrio en varios tratamientos detallados en el material y método. En forma posterior a estos tres experimentos se muestran los resultados de los análisis químicos, a fin de discutir si existen diferencias en la composición de los exudados liberados por las plantas utilizadas en los experimentos. Finalmente, se presentan y discuten los resultados obtenidos en la evaluación de la

respuesta de larvas a la presencia de raíces, ausencia de raíces y a una enmienda orgánica en forma de estiércol en el suelo.

4.1 Respuesta de larvas de *Hylamorpha elegans* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses. Experimento 1.

El período de exposición de las larvas al riego con los exudados de los distintos tratamientos tuvo una duración de un mes. A pesar de la corta duración de este ensayo, las larvas recolectadas durante este período (mes de marzo) se encontraban en un período de alimentación activo, por lo cual era probable obtener una respuesta si los posibles compuestos alelopáticos exudados por las raíces fueran ingeridos a través del sustrato que las larvas consumían. Según Carrillo (1999) el mayor daño de *H. elegans* se produce en el tercer estadio larval, estadio que corresponde al utilizado en este experimento. No obstante el mayor daño de estas larvas durante este estadio, estaría asociado a una acción mecánica de cortar las raíces al moverse en el suelo (DURAN, 2002), siendo posible que las larvas de este estadio no requieran alimentarse de las raíces de las plantas para sobrevivir, pudiendo desarrollar su ciclo de vida alimentándose de la materia orgánica del suelo (Carrillo, 2001, citado por PAPE, 2001). Los parámetros de sobrevivencia y variación de peso larval medidos en este experimento sobre macetas con suelo, si bien pueden verse afectados por la falta de raíces de plantas como suministro alimenticio, este efecto debiera ser parejo, permitiendo medir los posibles efectos alelopáticos de los diferentes exudados aplicados como riego al suelo donde permanecían las larvas consumiendo materia orgánica.

4.1.1 Sobrevivencia. La sobrevivencia de las larvas de tercer estadio de *H. elegans* fue similar en los distintos tratamientos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas. Los valores promedios de sobrevivencia obtenidos en cada uno de los

tratamientos de este experimento (Cuadro 1, Anexo 32) son inferiores a los obtenidos por PALMA (2004) para esta especie, al usar suelo con plantas, determinando al cabo de 3 meses un 54% de sobrevivencia larval en suelo con plantas de *L. perenne* mantenidas a razón de 10 larvas por maceta. Por su parte ROJAS (1994) determinó que larvas de tercer estadio de *H. elegans* mantenidas durante 3 meses sobre distintas especies pratenses presentan alrededor de un 70% de sobrevivencia.

Si se considera que las larvas de *H. elegans* presentan bajos niveles de competencia intraespecífica, se descarta que esta baja sobrevivencia se deba a factores de competencia (ROTHMANN, 1994). Por lo anterior, la baja sobrevivencia larval promedio obtenida en este experimento sobre suelo sin plantas en todos los tratamientos (39%), comparada a la obtenida por ROJAS (1994) y PALMA (2004) en presencia de especies forrajeras, hacen suponer que si bien las larvas de *H. elegans* pueden sobrevivir en ausencia de raíces, consumiendo la materia orgánica del suelo, aparentemente las raíces constituirían un aporte importante a los requerimientos alimenticios de estas larvas favoreciendo así su sobrevivencia. En ensayos de laboratorio se ha determinado que la condición corporal, medida a través del peso de larvas, mantenidas con suelo y plantas de *L. perenne* era mayor a la con suelo y sin plantas*.

Esta falta de respuesta puede deberse por una parte a que las diferentes especies forrajeras utilizadas en este experimento exudan cantidades de compuestos solubles en agua muy pequeñas, lo cual fue demostrado en esta investigación al realizar los análisis fitoquímicos a estos exudados (Cuadros 13 al 19).

*Carrillo, R. 2005. Ing. Agr., M.Sc., Ph.D. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia. Comunicación personal.

Al respecto Fitter, 2003, citado por WEIR *et al.* (2004), señala que una de las dificultades en los estudios de alelopatía en plantas es que los compuestos tóxicos que son transportados de una planta a otra probablemente no se encuentran suficientemente concentrados para tener un efecto sobre la otra planta, y estos compuestos sólo se encontrarían en concentraciones mucho mayores alrededor de la planta que lo produce, esta situación puede extrapolarse a la relación que pudiera presentarse entre plantas y larvas.

CUADRO 1 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)
<i>M. sativa</i>	36,67 a
<i>T. subterraneum</i>	40,00 a
<i>T. repens</i>	43,33 a
<i>L. perenne</i>	36,67 a
Suelo sin plantas	38,33 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Otra posible razón que explica esta falta de respuesta es que los compuestos en la solución percolada se encontraban tan diluidos (los niveles de fenoles y ácidos orgánicos fueron menores a 1 ppm) que no afectaron la sobrevivencia larval de esta especie de escarabeido, considerando que para la obtención de la solución percolada fue necesario saturar con agua el suelo que contenía las especies forrajeras en estudio de tal manera de obtener suficiente cantidad de solución para el riego de las macetas con larvas. Por otra parte, el período de exposición de

las larvas a estos compuestos (1 mes) pudo haber sido insuficiente para obtener una respuesta. Otra razón es que los compuestos liberados por las raíces hayan permanecido adsorbidos a los coloides del suelo, tomando en cuenta que estos debido a su escaso tamaño poseen una gran superficie por unidad de volumen, lo cual les proporciona una gran capacidad de adsorción, y mantención de los nutrientes vegetales, sean aniones o cationes, restringiendo su pérdida por lixiviación (PRASAD y POWER, 1997). En suelos de origen volcánico, como el utilizado en estos experimentos, se ha informado que aparentemente los mecanismos químicos estabilizan rápidamente el material orgánico, formando complejos organo-minerales (ZAGAL y CÓRDOBA, 2005). Además de las arcillas, también son importantes las sustancias húmicas, las cuales adsorben compuestos orgánicos a través de uniones temporales por puentes hidrógeno, asociaciones iónicas o fuerzas de van der Waals o por uniones más permanentes de los compuestos orgánicos a las sustancias húmicas por la formación de enlaces covalentes. Ejemplos de compuestos orgánicos que pueden unirse covalentemente a ácidos húmicos incluyen aminoácidos, péptidos, proteínas, compuestos aromáticos y polisacáridos (TATE, 2000).

4.1.2 Variación de peso. En el caso de la variación en el peso de las larvas de *H. elegans*, al ser regadas con el agua percolada de los maceteros que contenían las distintas especies forrajeras, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque se observó un aumento de peso en el tratamiento consistente en el riego de las larvas con los exudados liberados por las raíces de plantas de ballica y la mayor variación negativa de peso en el caso del riego con el agua percolada desde el suelo sin plantas (Cuadro 2, Anexo 33).

CUADRO 2 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.

Tratamiento	Variación de peso (g)
<i>M. sativa</i>	-0,005 a
<i>T. subterraneum</i>	-0,002 a
<i>T. repens</i>	-0,005 a
<i>L. perenne</i>	0,009 a
Suelo sin plantas	-0,009 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Si bien en todos los tratamientos las larvas se encontraban en un suelo sin plantas, es posible asumir que la aplicación de las soluciones percoladas de las especies forrajeras en estudio, pudieran tener en el caso de algunas especies de plantas un efecto benéfico sobre el incremento de peso larval, comparado con el agua del suelo. Al respecto BROWN y GANGE (1990) señalan que los compuestos químicos involucrados en las respuestas conductuales de los insectos que se alimentan de raíces pueden ser fagoestimulantes, atrayentes, e inhibidores. Así los exudados liberados por las raíces de las plantas podrían contener azúcares, ácidos orgánicos, y compuestos fenólicos (DAKORA Y PHILLIPS, 2002), sustancias que pueden constituir fuentes nutritivas promotoras del crecimiento larval favoreciendo el desarrollo de las poblaciones de insectos en el suelo.

Debido a que este efecto no fue estadísticamente significativo, posiblemente a las mismas razones expuestas para el caso de la sobrevivencia, se sugiere alargar el período de exposición de las larvas a estas soluciones percoladas en futuros experimentos, con esta especie de escarabeido.

Si la corta duración de este experimento hubiera sido la limitante principal por la cual la respuesta fue similar para los distintos tratamientos tanto en sobrevivencia como variación de peso, cabría esperar una respuesta más pronunciada al realizar un segundo experimento con un período de exposición larvario más prolongado a esta solución conteniendo los diferentes analitos.

4.2 Respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses. Experimento 2.

Este experimento tuvo una duración más prolongada que el experimento 1 realizado con *H. elegans*. Se debe considerar que *P. herrmanni* pertenece a otra subfamilia de escarabeidos (Melolonthinae) con larvas que, según la literatura, se alimentan principalmente de raíces de plantas en comparación a la subfamilia Rutelinae, a la cual pertenece *H. elegans*, con larvas que se alimentan de residuos orgánicos, pero que en ausencia de éstos son capaces de consumir raíces (RITCHER, 1966). Por lo anterior, las respuestas de esta especie de escarabeido no necesariamente van a ser similares a las obtenidas en el experimento 1. A continuación se presentan los resultados obtenidos para el experimento 2.

4.2.1 Sobrevivencia. La sobrevivencia larval durante las dos primeras evaluaciones (1 y 2 meses) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (Cuadro 3, Anexo 34). En el Cuadro 3 se observa que la totalidad de las larvas, independiente del tratamiento, tuvieron sobrevivencias que fueron disminuyendo con el transcurso del tiempo. El porcentaje promedio de sobrevivencia obtenido en todos los tratamientos a los 2 meses de evaluación (55,8%) es considerado alto, por lo que el suelo sin plantas

constituiría un sustrato aceptable para la vida de esta especie de escarabeido en el suelo.

CUADRO 3 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	
	12/06/04	12/07/04
<i>M. sativa</i>	79 a	53 a
<i>T. subterraneum</i>	80 a	64 a
<i>T. repens</i>	77 a	51 a
<i>L. perenne</i>	77 a	54 a
Suelo sin plantas	83 a	53 a
Suelo regado con agua destilada	88 a	60 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Cabe señalar, además, que al primer período de evaluación (1 mes) el porcentaje promedio de sobrevivencia de *P. herrmanni* en todos los tratamientos (80,7%) fue muy superior al obtenido en igual período de tiempo y bajo las mismas condiciones por *H. elegans* en el experimento 1 (45,0%). Esta diferencia podría ser atribuida a que normalmente las larvas de *H. elegans* se presentan en menores densidades poblacionales que *P. herrmanni* en el suelo, presentando aparentemente menores niveles de sobrevivencia en el suelo. Al respecto NORAMBUENA Y AGUILERA (1988) señalan que las poblaciones de *H. elegans* pueden alcanzar niveles máximos de 300 larvas/m² mientras que para *P. herrmanni* mencionan densidades máximas de 1.056 larvas/m².

En este caso tampoco se observa un efecto de los exudados sobre larvas, lo cual puede deberse, entre otros, a las bajas concentraciones de exudados presentes (Cuadros 11-19).

4.2.2 Variación de peso. En relación a la variación en el peso de las larvas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos, determinándose al primer y segundo mes de evaluación una disminución del peso larval en todos los tratamientos (Cuadro 4, Anexo 35). Este efecto puede ser debido, por una parte, a que la solución percolada desde las raíces de las especies forrajeras en estudio, así como el agua percolada del suelo sin plantas no aportó suficientes nutrientes para obtener un aumento de peso larval, y por otra parte a que estos exudados, así como el agua percolada del suelo sin plantas aplicada directamente sobre las macetas con las larvas, no tendrían los analitos en cantidades o concentraciones suficientes para producir toxicidad en las larvas de escarabeidos, lo cual se habría expresado en una disminución de la sobrevivencia de estas larvas, lo que no ocurrió en este experimento. También es posible que las larvas ya al inicio del ensayo hayan acumulado las reservas alimenticias suficientes para alcanzar su desarrollo completo, utilizándolas durante el período en que transcurrió el experimento.

Un estudio realizado en laboratorio por RIDSDILL-SMITH (1975) demostró que si bien las larvas del escarabeido *S. nigrolineata* ingieren materia orgánica desde un suelo sin plantas, la presencia de raíces vivas produce un mayor incremento en la cantidad de materia orgánica removida desde el intestino de las larvas y en la tasa de crecimiento larval, por lo cual la materia orgánica del suelo consumida por estas larvas en los diferentes tratamientos de este ensayo, sería insuficiente para obtener un incremento de su peso, lo cual concordaría con lo encontrado. Estos resultados sugieren además la necesidad de realizar experimentos a fines de dilucidar la respuesta de ambas especies de escarabeidos a la presencia de distintas fracciones de materia orgánica así como a la presencia de estiércol ya que se ha señalado en estudios realizados en el

extranjero que las larvas de *C. zealandica* pueden vivir alimentándose de materia orgánica, en ausencia de tejido vegetal vivo (RADCLIFFE, 1970; FARREL Y SWENEY, 1972; 1974 a, b; KAIN Y ATKINSON, 1977; PRESTIDGE et al., 1985), lo cual pudiera ser el caso de los escarabeidos presentes en las praderas de la zona sur de Chile.

CUADRO 4 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada en dos fechas de evaluación.

Tratamiento	Variación de peso (g)	
	12/06/04	12/07/04
<i>M. sativa</i>	-0.0352 a	-0.0015 a
<i>T. subterraneum</i>	-0.0373 a	-0.0228 a
<i>T. repens</i>	-0.0503 a	-0.0016 a
<i>L. perenne</i>	-0.0432 a	-0.0146 a
Suelo sin plantas	-0.0455 a	-0.0018 a
Suelo regado con agua destilada	-0.0468 a	-0.0121 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Cabe mencionar que este experimento se inició el 12 de mayo del año 2004, período considerado de activa alimentación por parte de las larvas y, por lo tanto, de daño para las praderas en la zona sur de Chile, pero que en realidad corresponde al fin del período de alimentación de raíces de las larvas de acuerdo a lo observado por PALMA (2004), lo que hace pensar que estas larvas presentarían muy buenas condiciones adaptativas a la falta de alimento por períodos prolongados, lo cual fue posible comprobar con las mediciones efectuadas en el

experimento 3. Al respecto, estudios hechos en trigo, con esta especie de escarabeido, muestran una ausencia de daño de las larvas desde mediados de mayo en adelante (SURBER, 2001).

La disminución en el peso de las larvas en la totalidad de los tratamientos no fue obstáculo para que las larvas lograran alcanzar el estado adulto, lo cual se muestra en detalle en el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación final de este experimento.

4.2.3 Sobrevivencia final experimento 2. La sobrevivencia de *P. hermanni* en todos los tratamientos, al cabo de aproximadamente 3 meses y medio (6 de septiembre de 2004), fue en general baja, variando entre 7 y 18 por ciento. Esta evaluación consideró la totalidad de los ejemplares recuperados fueran éstos larvas, pupas o adultos y cada estado de desarrollo del insecto por separado.

CUADRO 5 Sobrevivencia final de larvas de tercer estadio de *P. hermanni* en suelo sin vegetación, regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.

Tratamiento	Sobrevivencia final (%) por estado de desarrollo			
	Larva	Pupa	Adulto	Total
<i>M. sativa</i>	6 a	4 a	2 a	12 a
<i>T. subterraneum</i>	2 a	4 a	1 a	7 a
<i>T. repens</i>	6 a	4 a	1 a	11 a
<i>L. perenne</i>	5 a	5 a	0 a	10 a
Suelo sin plantas	10 a	4 a	4 a	18 a
Agua destilada	3 a	5 a	0 a	8 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Si se analiza esta sobrevivencia final obtenida en el experimento 2 por cada uno de los estados de desarrollo del insecto (Cuadro 5), se observa aparentemente una mayor recuperación de ejemplares al estado larval y adulto en el tratamiento que fue irrigado con la solución percolada desde suelo sin plantas. Sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre este tratamiento y los restantes.

Lo anterior, sugiere que el suelo tendría buenas condiciones para la mantención de las larvas, lo que puede significar que el ambiente en el cual se desarrollan estos insectos, aunque no posee nutrientes en cantidades que hagan subir de peso al insecto y en consecuencia optimizar su desarrollo, sí es capaz de satisfacer los requerimientos mínimos de nutrientes ya sea lavados desde el suelo y obtenidos de la solución del suelo, o bien obtenidos directamente desde el suelo, a través de organismos simbiotes. A su vez, esto puede indicar que las larvas son capaces de mantenerse en un suelo sin presencia de raíces, una vez que alcanzan un peso determinado a principios de mayo y no son afectadas por los compuestos contenidos en los exudados solubles en agua liberados por las raíces de las especies pratenses, pudiendo alcanzar el estado adulto sin consumir tejido vegetal vivo. Además, estos resultados muestran que los exudados radicales no afectaron la sobrevivencia larval de *P. herrmanni*.

4.2.4 Peso alcanzado por los distintos estados de desarrollo de *P. herrmanni* al final del experimento 2. Los pesos finales alcanzados por las larvas de *P. herrmanni* tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (Cuadro 6, Anexo 37).

CUADRO 6 Peso final por estado de desarrollo de *P. herrmanni*

Tratamiento	Peso final (g) por estado de desarrollo		
	Larva	Pupa	Adulto
<i>M. sativa</i>	0.2763 a	0.2745	0.1724
<i>T. subterraneum</i>	0.2364 a	0.2006	0.149
<i>T. repens</i>	0.2272 a	0.2237	0.1446
<i>L. perenne</i>	0.2359 a	0.2673	-----
Suelo sin plantas	0.2726 a	0.2377	0.1174
Agua destilada	0.2534 a	0.2212	-----

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos según test de Tukey ($P < 0.005$). Sólo se analizó estadísticamente el peso final de las larvas.

Al no existir diferencias entre los exudados de plantas y el suelo sin plantas y agua destilada, los resultados indican que no hubo respuesta a los exudados percolados desde los diferentes tratamientos, lo cual no es extraño, puesto que una vez realizados los análisis químicos a estos exudados se comprobó que la totalidad de los tratamientos con suelo arrojaron lecturas de concentraciones muy pequeñas en los distintos compuestos analizados (Cuadros 14 y 17) y que esta respuesta tampoco se produjo al obtener exudados de raíces de plantas mantenidas en lana de vidrio que sí poseían mayores niveles de exudados (Cuadros 12 y 13) y por lo tanto, era esperable una respuesta más clara.

4.3 Respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses cultivadas en condiciones hidropónicas. Experimentos 3 y 4.

En forma paralela al experimento 2 se realizaron dos experimentos a fin de obtener una respuesta de larvas de *P.*

herrmanni al riego con el agua percolada desde macetas conteniendo plantas cultivadas de forma hidropónica tanto en arena como en lana de vidrio. Considerando que el efecto de las sustancias inhibidoras es más pronunciado en suelos arenosos que en suelos ricos en materia orgánica, ya que la activación y destrucción de los exudados son más lentas en suelos pobres, se puede esperar una mayor influencia alelopática en plantas en suelos arenosos que en suelos ricos en microorganismos y fracciones coloidales (Barcik, 1999, citado por DE PAULA et al., 2000). En base a lo anterior, sería posible obtener una respuesta más precisa a los exudados solubles en agua liberados desde las raíces de los diferentes tratamientos aplicados sobre macetas conteniendo las larvas en sustratos con cantidades muy inferiores en materia orgánica, como son la arena lavada y lana de vidrio. También, para aumentar la exactitud en los datos obtenidos, se incluyó sólo una larva por macetero, haciendo un seguimiento del peso de cada una de ellas en los distintos tratamientos. Estos tratamientos están detallados en el punto 3.2.3 del material y método.

4.3.1 Respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses cultivadas en arena. Experimento 3. Los valores de sobrevivencia y variación de peso de las larvas se presentan y discuten a continuación.

4.3.1.1 Sobrevivencia. En el Cuadro 7, se observa que la totalidad de los tratamientos presentaron sobrevivencias similares, es decir, al cabo de tres meses sólo quedaba una larva viva (17%). Esta escasa sobrevivencia al usar arena como sustrato sugiere que la presencia de materia orgánica humificada del suelo sin vegetación pueda contribuir de forma positiva en la sobrevivencia larval, considerando que al encontrarse en

niveles mínimos en el sustrato (arena), se obtuvieron menos individuos sobrevivientes que en el caso de un suelo sin plantas. Este efecto se ve más claramente al revisar la sobrevivencia larval en suelo sin vegetación presentada en el Cuadro 9.

CUADRO 7 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con exudados solubles desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.

Tratamiento	Sobrevivencia (%) por fechas				
	13/05/04	03/06/04	23/06/04	12/07/04	12/08/04
AAARAR	100	83 a	67 a	33 a	17
TSARAR	100	100 a	50 a	33 a	17
TBARAR	100	100 a	100 a	33 a	0
BIARAR	100	100 a	83 a	50 a	17
ARAR	100	100 a	100 a	50 a	17

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). Sólo fueron analizados estadísticamente los promedios de los tratamientos correspondientes a la fechas 03/06/04, 23/06/04 y 12/07/04.

Aunque la sobrevivencia fue baja, ésta lo fue para los diferentes tratamientos, lo que indica que aparentemente no existen factores de mortalidad distintos entre ellos. Sin embargo, tampoco es posible descartar un efecto abrasivo de la arena, lo cual pudo haber incidido en un aumento de la mortalidad larval*.

*Carrillo, R. 2005. Ing. Agr., M.Sc., Ph.D. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia. Comunicación personal.

En el Cuadro 7 y Anexo 38, se observa que a los dos meses de haber estado sometidas las larvas a los distintos tratamientos, la sobrevivencia había bajado aproximadamente al 40%, considerando la totalidad de los tratamientos. Sin embargo, un punto importante es que las larvas soportaron un período muy largo (tres meses) en condiciones de extrema falta de alimento, con mortalidades similares entre aquellas regadas con la solución percolada desde maceteros con plantas y aquellas regadas con la solución percolada desde arena desnuda. Esto pudiera indicar que las larvas de *P. herrmanni* son capaces de sobrevivir a lo menos tres meses sin alimento o que obtendrían una dieta mínima de mantención desde los microorganismos y/o sustancias liberadas por ellos, una vez alcanzado un peso promedio de $3,87 \pm 0,7$ g que fue el peso promedio inicial de este ensayo. También esto corrobora que los exudados percolados desde los distintos tratamientos con plantas no aportan suficientes nutrientes que les permita obtener una mayor sobrevivencia a las larvas, ni contienen principios tóxicos a las larvas que produzcan su mortalidad.

4.3.1.2 Variación de peso. El peso de las larvas en general fue disminuyendo con el tiempo, lo cual era lo esperado (Cuadro 8, Anexo 39).

Cabe mencionar que al disectar el intestino de algunas larvas se observó la presencia de arena en su interior. Estos resultados confirman que los exudados percolados desde los distintos tratamientos con plantas no aportan suficientes nutrientes que les permita obtener un mayor peso a las larvas y que los compuestos presentes en los exudados solubles en agua no tienen principios desfavorables, ya sea a través de toxicidad o inhibición de la alimentación, considerando que la arena permitiría la lixiviación de los exudados con una mínima o nula adsorción de los compuestos.

CUADRO 8 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.

Tratamiento	Variación de peso (g)			
	03/06/04	23/06/04	12/07/04	12/08/04
AAARAR	-0.0294 a	-0.0420 a	-0.0139 a	-0.0200
TSARAR	-0.0372 a	0.0092 a	-0.0102 a	-0.0599
TBARAR	-0.0347 a	-0.0270 a	-0.0756 a	-----
BIARAR	-0.0185 a	-0.0233 a	-0.0424 a	-0.1137
ARAR	-0.0255 a	-0.0431 a	-0.0035 a	-----

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). Sólo fueron analizados estadísticamente los promedios de los tratamientos correspondientes a la fechas 03/06/04, 23/06/04 y 12/07/04.

4.3.2 Respuesta de larvas de *P. herrmanni* a los exudados solubles en agua, liberados por las raíces de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio. Experimento 4. Considerando la escasa o nula capacidad de adsorción de este material y esperando que los exudados tuvieran menos problemas de ser lixiviados por el agua aplicada en el riego, se evaluó la sobrevivencia y variación de peso de larvas sometidas al riego con el agua percolada desde plantas en macetas cultivadas en forma hidropónica, los resultados fueron los siguientes.

4.3.2.1 Sobrevivencia. Este experimento fue realizado simultáneamente con el de respuesta de una larva mantenida en arena al riego por la solución percolada desde cultivos en arena y las condiciones del ensayo son las mismas a excepción del sustrato utilizado para la obtención de las plantas, por ello sus resultados son comparables a los observados en el experimento con plantas en arena. En el Cuadro 9 y Anexo 40 se presentan los resultados obtenidos. En ellos se observa que las

larvas nuevamente obtuvieron sobrevivencias muy bajas al cabo de tres meses, lo que confirma los supuestos realizados en el análisis de los resultados para los tratamientos con las especies cultivadas hidropónicamente con arena lavada.

CUADRO 9 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo

Tratamiento	Sobrevivencia (%) por fechas				
	13/05/04	03/06/04	23/06/04	12/07/04	12/08/04
AALVAR	100	100 a	33 a	17	0
TSLVAR	100	100 a	67 a	33	0
TBLVAR	100	100 a	67 a	50	17
BILVAR	100	100 a	33 a	0	0
LVAR	100	100 a	67 a	17	0
SU	100	100 a	67 a	50	33
SUSU	100	100 a	87 a	50	17

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). Sólo fueron analizados estadísticamente los promedios de los tratamientos correspondientes a la fechas 03/06/04, y 23/06/04.

En términos generales, al igual que en el experimento 3, se observa que la sobrevivencia fue disminuyendo en la medida que avanzaba el período de exposición de las larvas a los distintos tratamientos, pero en este experimento, al final del período de evaluaciones, sólo fue posible obtener individuos que sobrevivieron un período de tres meses en los tratamientos: en que la larva se mantuvo en suelo sin plantas regado sólo con agua destilada, en el regado con la solución percolada a través de un suelo sin plantas y en el que la arena fue regada con la solución percolada desde plantas de trébol blanco cultivado en lana de vidrio.

Estos resultados llaman la atención, puesto que aunque en ninguno de los experimentos sometidos a análisis estadístico se presentó diferencias estadísticamente significativas, el hecho que la solución de suelo percolada desde un suelo sin plantas y la solución percolada desde plantas de trébol blanco produzca en algunos casos una sobrevivencia mayor aunque no significativa sugieren la posibilidad de que exista alguna respuesta positiva de las larvas a los compuestos lixiviados en el suelo sin cultivo y a los compuestos contenidos en los exudados solubles en agua de raíces de trébol blanco. Con respecto a esta leguminosa, se ha indicado en numerosos estudios para los escarabeidos nativos de Nueva Zelandia, que esta especie forrajera es beneficiosa nutricionalmente para las larvas de escarabeidos y susceptible al ataque de ellas. Sin embargo, también se ha indicado que la gramínea forrajera *L. perenne* es susceptible y beneficiosa para el desarrollo de esas larvas, pero esta respuesta no se observa en este caso del estudio del efecto de los exudados solubles liberados por las raíces. Una explicación a esta ausencia de respuesta es que las larvas consuman sustancias presentes en las raíces que no necesariamente se encuentren en los exudados. El hecho de no haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas podría no corresponder a diferencias reales sino a la gran variabilidad entre los valores obtenidos entre las distintas repeticiones y no corresponder a una respuesta de las larvas de escarabeidos.

4.3.2.2 Variación de peso. La variación en peso de las larvas mantenidas en cultivos de las forrajeras en forma hidropónica en lana de vidrio fue en general negativa (Cuadro 10) y no se encontraron diferencias entre los resultados de la primera evaluación (03/06/04) que pudieron ser analizados estadísticamente.

CUADRO 10 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo

Tratamiento	Variación de peso (g)			
	03/06/04	23/06/04	12/07/04	12/08/04
AALVAR	-0.1024 a	0.0092	-0.0907	----
TSLVAR	-0.0378 a	0.0243	-0.0808	----
TBLVAR	-0.0007 a	-0.0307	-0.0962	0.0275
BILVAR	-0.0222 a	-0.0509	-0.3484	----
LVAR	-0.0781 a	-0.0243	-0.0084	----
SU	-0.0781 a	-0.0189	-0.0481	-0.0243
SUSU	-0.0857 a	-0.0212	-0.0350	0.0254

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). Sólo fueron analizados estadísticamente los promedios de los tratamientos correspondientes a la fechas 03/06/04.

Esto confirma que las larvas fueron sucesivamente agotando sus reservas acumuladas probablemente en el período anterior al inicio de estos ensayos y consecuentemente bajando su peso. Por otra parte, si ellas hubieran necesitado sólo la presencia de materia orgánica en forma de humus en el suelo para aumentar de peso, se esperaba que las larvas en los tratamientos mantenidas con suelo sin plantas aumentaran su peso consumiendo esta materia orgánica del suelo, lo que no fue observado. En efecto, los tratamientos con suelo sin plantas también presentaron respuestas similares, por lo que se descarta que el suelo sin plantas fuera suficiente para que estas larvas logaran una ganancia de peso, al menos en el periodo considerado en este experimento. No obstante lo anterior, el suelo sin plantas permitió que las larvas se mantuvieran vivas en una mayor proporción durante el experimento.

La gran mortalidad encontrada en los distintos tratamientos era esperable para el caso de las larvas que fueron mantenidas en arena, pero se esperaba encontrar alguna diferencia

importante en comparación a las larvas mantenidas en suelo sin plantas, lo cual no fue observado. Tanto la arena como la lana de vidrio aportarían una mínima cantidad de compuestos utilizables como fuentes alimenticias por las larvas y este aporte pudiera estar relacionado a la presencia de microorganismos en los diferentes sustratos, los cuales serían capaces de modificar la calidad y cantidad de los exudados presentes en la rizósfera. Por esto se sugiere realizar este tipo de experiencia en condiciones estériles, a fin de estimar el efecto de los compuestos independientes del sustrato. Este tercer experimento fue más riguroso en relación a medir la respuesta de las larvas a la aplicación directa de los exudados, pero presenta importantes limitaciones por la falta de un mayor número de observaciones y repeticiones que pudieran ser sometidas a análisis estadístico.

Analizados en su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente discutidos conducen a rechazar la hipótesis de que las larvas de tercer estadio de ambas especies de escarabeidos sean afectadas en su peso y sobrevivencia al ser expuestas a compuestos exudados por las raíces de las plantas forrajeras bajo las condiciones de estos experimentos.

4.4 Resultados de los análisis químicos al agua percolada desde los suelos con y sin plantas.

A partir de las muestras del agua percolada obtenida de los distintos tratamientos, se determinaron los carbohidratos totales, fenoles totales y los ácidos orgánicos: fumárico, málico, malónico, cítrico y succínico.

4.4.1 Carbohidratos totales. Como ha sido señalado previamente, los análisis colorimétricos sólo arrojaron resultados comparables para los líquidos percolados colectados en la última fecha (23/07/04). Las reacciones en las fechas anteriores

(17/03/04 y 20/04/04) dieron lecturas poco confiables debido a la formación de precipitados de apariencia lechosa en varios tratamientos por lo cual no son presentadas en este trabajo. Esto pudo deberse a la presencia de sales en los lixiviados ya sea por un lavado insuficiente de las macetas o una reacción con las sales agregadas en forma de solución nutritiva o las propias del suelo. Al respecto HENRY (2003) señala que las sales de soluciones nutrientes interfieren en los análisis de exudados, por ejemplo HPLC y prueba de la antrona. Por otra parte, WEIL *et al.*, (2003), han señalado que la reacción de la antrona está sujeta a la interferencia por constituyentes comunes del suelo tales como Cl^- , NO_3^- y Fe^{+2} . También se ha informado acerca de la interferencia de las sustancias húmicas en la determinación de azúcares de suelos con otros métodos colorimétricos (GIZYBOUSKY Y DUDZINSKA, 2004).

A pesar de las limitaciones para los análisis de las muestras colectadas en la primera y segunda fecha de muestreo, descritas anteriormente, los análisis para la última fecha fueron realizados sin problemas. Los resultados de estos análisis se presentan por separado para cada uno de los sustratos utilizados (suelo, arena y lana de vidrio). Para una mejor comparación de los resultados obtenidos, se incorporaron en los Cuadros de los experimentos de arena y lana de vidrio los valores de los tratamientos en suelo sin plantas.

Al analizar los resultados obtenidos utilizando suelo como sustrato (Cuadro 11) se observa que los líquidos percolados del trébol subterráneo presentaron el mayor contenido de azúcares totales, mientras que los percolados de alfalfa y ballica inglesa presentaron niveles de azúcares significativamente inferiores a este, los otros tratamientos presentaron niveles intermedios de azúcares.

CUADRO 11 Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas (23/07/04).

Tratamiento	Carbohidratos solubles totales (ppm)
SUAL	0,84 b
SUTS	3,55 a
SUTB	1,78 ab
SUBI	0,97 b
SUSU1	1,67 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En el Cuadro 11 se observa también que los niveles de azúcares totales detectados en los líquidos percolados de los distintos tratamientos de suelo fueron en general bajos, no presentándose diferencias muy marcadas entre ellos. Lo anterior podría deberse a distintas razones, las cuales se analizan a continuación.

Según GREENLAND y OADES, (1975), los monosacáridos libres son difíciles de detectar en muchos suelos debido probablemente a la rapidez con que ellos son utilizados por los microorganismos. Ellos indican, además, que la presencia de carbohidratos en exudados radicales ha sido demostrada bajo condiciones estériles, mientras que en condiciones no estériles estos azúcares tendrían menos posibilidades de ser detectados al ser un suministro rápidamente disponible para los microorganismos.

En relación a los suelos utilizados en este experimento, se ha indicado que en general ellos presentan en condiciones naturales una alta presencia de hongos y actinomicetos considerados los grupos de microorganismos más activos del suelo en cuanto a su capacidad de descomposición y síntesis de materiales orgánicos estables, tales como, ácidos fúlvicos,

húmicos y polisacáridos (Martín y Haydee, 1971, citados por ZUNINO *et al.*, 1982)

Una situación diferente se obtuvo al analizar los resultados obtenidos utilizando arena y lana de vidrio como sustrato (Cuadros 12 y 13).

CUADRO 12 Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

Tratamiento	Carbohidratos solubles totales (ppm)
ARAL	5,89 b
ARTS	5,41 b
ARTB	4,06 b
ARBI	23,00 a
ARAR	5,07 b
SUSU2	1,58 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En el Cuadro 12 se puede observar que el contenido de carbohidratos totales de los distintos tratamientos de los percolados de arena presentaron diferencias estadísticamente significativas, siendo los percolados de ballica inglesa los con mayor contenido de azúcares, en comparación al resto de los tratamientos. Esto sería indicativo que esta gramínea libera más azúcares al medio y podría asociarse este resultado a su mayor preferencia por parte de las larvas, tal como ha sido demostrado en experimentos en macetas por ROJAS (1994). Un estudio realizado por TISDALL y OADES (1980) informó que el sistema radical de esta especie pratense era más eficiente que las raíces de trébol blanco para producir la estabilización de agregados de suelo, debido a que sustentaba una mayor población de hifas de micorrizas versículo-arbusculares en el suelo, y

mediante micrografías electrónicas observaron que las hifas estaban cubiertas con una capa de material amorfo, atribuida a la presencia de polisacáridos, a los cuales las partículas de arcillas parecían firmemente adheridas. Si lo anterior fuera confirmado, entonces existiría la posibilidad que con el riego estas secreciones fueran arrastradas y podría explicar en algún grado la detección de estos compuestos en los lixiviados analizados en este estudio. Un resultado similar se obtuvo en el análisis del contenido de azúcares totales de los percolados en lana de vidrio (Cuadro 13).

En general, los análisis arrojaron diferencias significativas entre la cantidad de azúcares percolados desde ballica inglesa, la cual fue más alta en comparación a las demás especies y al suelo sin plantas.

CUADRO 13 Carbohidratos solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas (23/07/04).

Tratamiento	Carbohidratos solubles totales (ppm)
LVAL	2,92 bc
LVTS	5,79 b
LVTB	6,69 ab
LVBI	11,13 a
LVAR	5,07 b
SUSU2	1,58 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

También se encontró una pequeña cantidad de azúcares en los sustratos sin plantas, lo cual puede atribuirse tanto a la presencia de estos compuestos en la fracción orgánica del suelo como a la presencia de microorganismos en el medio. En relación a los microorganismos, HENRY (2003), señala que la presencia de

microbios en la rizósfera puede cambiar la cantidad de exudados radicales a través de su metabolismo y la composición de estos exudados a través de su degradación parcial y se ha observado que los microorganismos son capaces de aumentar su liberación. La misma autora señala que algunos de los mecanismos propuestos para producir este aumento incluyen un mayor gradiente de concentración de exudados entre la superficie de la raíz y la rizósfera con la degradación microbiana o un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares radicales y el estímulo de la liberación de exudados por los metabolitos microbianos.

4.4.2 Fenoles totales. Los resultados de los análisis de fenoles totales presentes en la solución percolada de distintas especies pratenses en suelo con plantas, sin plantas y plantas cultivadas hidropónicamente en arena y lana de vidrio, en las tres fechas de colecta se presentan en los Cuadros 14 al 16.

CUADRO 14 Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.

Tratamiento	Fenoles totales (ppm) por fecha de colecta		
	17/03/04	20/04/04	23/07/04
SUAL	0,72	0,35	0,43
SUTS	0,46	0,28	0,33
SUTB	0,26	0,21	0,33
SUBI	0,31	0,19	0,27
SUSU2	0,36	0,33	0,60
PROM. TOTAL	0,42	0,27	0,39

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

CUADRO 15 Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas.

Tratamiento	Fenoles totales (ppm) por fecha de colecta		
	17/03/04	20/04/04	23/07/04
ARAL	0,39 a	0,43 b	0,66 ab
ARTS	0,24 a	0,47 b	1,09 a
ARTB	0,32 a	0,27 b	0,63 ab
ARBI	0,34 a	0,32 b	1,03 a
ARAR	0,54 a	1,04 a	0,56 ab
SUSU2	*n/d	*n/d	0,15 b
PROM. TOTAL	0,36	0,52	0,69

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). (* n/d = no determinado).

CUADRO 16 Fenoles solubles totales liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas.

Tratamiento	Fenoles totales (ppm) por fecha de colecta		
	17/03/04	20/04/04	23/07/04
LVAL	0,57 a	0,40 a	1,45 ab
LVTS	1,01 a	0,42 a	1,06 b
LVTB	0,69 a	0,40 a	1,47 ab
LVBI	0,95 a	0,48 a	1,95 a
LVAR	0,55 a	0,31 a	1,23 ab
SUSU2	*n/d	*n/d	0,15 c
PROM. TOTAL	0,75	0,40	1,22

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$). (*n/d = no determinado).

El análisis de fenoles totales arrojó diferencias estadísticamente significativas sólo en condiciones de cultivos hidropónicos, tanto en arena como en lana de vidrio (Cuadro 15 y 16), estas diferencias se manifestaron principalmente en la última fecha de colecta y el tratamiento de suelo sin plantas presentó niveles de fenoles significativamente inferiores a todos los otros tratamientos. Esto pudiera estar confirmando la capacidad del suelo de adsorber los compuestos fenólicos debido a que en todos los tratamientos en que se utilizó este sustrato se obtuvieron niveles muy pequeños de fenoles totales y confirma por otro lado que tanto la arena como la lana de vidrio permiten detectar estos compuestos, aunque no se puede distinguir claramente si estos compuestos fenólicos son producto de lixiviados, los microorganismos presentes en el sustrato o una combinación de ellos.

4.4.3 Ácidos orgánicos. Al igual que en los análisis colorimétricos de determinación de azúcares totales con antrona, los resultados de los ácidos orgánicos en las dos primeras fechas de evaluación fueron escasos y erráticos. Por ello sólo se consideraron las lecturas de la última fecha de colecta de los líquidos percolados.

Además de las posibles razones comentadas en los análisis anteriores, tampoco es posible descartar que en el proceso de enjuague de las macetas hayan quedado trazas de detergente, puesto que se ha señalado que su presencia puede afectar un gran número de técnicas analíticas muy sensibles tales como las cromatografías y espectrometrías de masa (SWIDEREK *et al.*, 1997).

CUADRO 17 Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.

Tratamiento	Ácidos orgánicos (ppm) 23/07/04				
	Cítrico	Fumárico	Málico	Malónico	Succínico
SUAL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SUTS	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00
SUTB	0,00	0,00	1,87	0,00	0,00
SUBI	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
SUSU1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

CUADRO 18 Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas.

Tratamiento	Ácidos orgánicos (ppm) 23/07/04				
	Cítrico	Fumárico	Málico	Malónico	Succínico
ARAL	0,00	0,01	0,00	2,83	0,00
ARTS	0,46	0,00	4,69	5,65	0,00
ARTB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ARBI	0,00	0,00	0,00	0,00	12,74
ARAR	2,89	0,01	0,00	2,57	0,00
SUSU2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Al analizar los resultados obtenidos en la última fecha de colecta para los diferentes tratamientos utilizados, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el

contenido de ninguno de los ácidos orgánicos evaluados (Cuadros 17, 18 y 19).

Cabe señalar que el nivel de ácidos orgánicos obtenidos en los líquidos percolados de plantas en suelo y suelo sin plantas (Cuadro 17) no fueron detectados en la mayoría de los tratamientos, lo que dificulta la interpretación de estos resultados.

En términos generales, los resultados de los análisis de ácidos orgánicos, muestran una escasa detección de estos compuestos en los exudados de los distintos tratamientos, observándose más lecturas en los tratamientos de plantas cultivadas en forma hidropónica, pero mostrando una gran variación respecto a los tratamientos con suelo y arena. Basado en estos resultados se sugiere a futuro, para este tipo de estudios, un cambio en la metodología de colecta de los exudados que permita aumentar el volumen de agua colectada y sometida a liofilización y/o aumentar el período de contacto entre las raíces y el agua de colecta, por ejemplo sumergiendo las raíces de plantas de edad conocida, cultivada en un sustrato que puede ser arena de cuarzo, durante un período determinado en un volumen de agua conocido.

Se descarta un mal procedimiento cromatográfico mediante HPLC, debido a que la lectura de los patrones, aún en muy bajas concentraciones fueron bien separadas y sus tiempos de retención claramente diferenciados, al igual que las presentadas por CAWTHRAY, (2003), utilizadas como referencia en este estudio.

Los resultados obtenidos en estos análisis apoyan los resultados discutidos en los experimentos 1 y 2 con larvas de escarabeidos ya que, aparte de obtenerse cantidades muy pequeñas de ácidos orgánicos en los exudados, también es posible que los compuestos hayan sido adsorbidos ya sea por el humus, la fracción coloidal o bien degradados por los microorganismos en el sustrato.

CUADRO 19 Ácidos orgánicos solubles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas.

Tratamiento	Acidos orgánicos (ppm) 23/07/04				
	Cítrico	Fumárico	Málico	Malónico	Succínico
LVAL	6,97 a	0,00 a	0,65 a	6,99 a	0,00 a
LVTS	0,79 a	0,00 a	0,00 a	0,05 a	0,00 a
LVTB	0,00 a	0,01 a	0,00 a	2,21 a	0,00 a
LVBI	0,00 a	0,01 a	0,00 a	8,37 a	0,00 a
LVAR	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,23 a	0,00 a
SUSU2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Cabe señalar, que los exudados radicales pueden ser rápidamente utilizados por los microorganismos, por lo que la estimación cuantitativa de su producción puede ser hecha sólo si las plantas son cultivadas bajo condiciones estériles, condición que no se evaluó en estos experimentos. Según BARBER y GUNN, (1974) un gran número de observaciones indica que las cantidades de exudados encontradas en condiciones axénicas (por ejemplo en lana de vidrio o en arena) son distintas a aquellas producidas en el suelo.

4.5 Respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a la ausencia de raíces y aumento del contenido de materia orgánica en forma de estiércol en el suelo. Experimentos 5 y 6.

Estos experimentos tuvieron como objetivo evaluar la respuesta, medida en base a la sobrevivencia y variación de peso de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni*, a la presencia de raíces de las distintas especies pratenses utilizadas en los experimentos anteriores, comparado con un suelo sin plantas y un

suelo al cual se realizó una enmienda orgánica consistente en la incorporación de estiércol de oveja al suelo.

4.5.1 Respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a la presencia de raíces y a una enmienda orgánica en forma de estiércol al suelo. Experimento 5. En este experimento se utilizaron materiales y métodos similares a los experimentos 1 y 2.

4.5.1.1 Sobrevivencia. La sobrevivencia en estos experimentos se presenta en el Cuadro 20. Estos resultados indican que las larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* presentan las mayores sobrevivencias cuando en el medio se presentan raíces de trébol subterráneo, ballica y mezcla de suelo con estiércol (35, 43 y 58% respectivamente).

Claramente, las menores sobrevivencias la obtuvieron las larvas en suelos con raíces de raíces de trébol blanco, alfalfa y suelo sin plantas con sobrevivencias promedios del 16, 9 y 2% respectivamente, en un período de 107 días.

CUADRO 20 Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)
<i>M. sativa</i>	9 b
<i>T. subterraneum</i>	35 a
<i>T. repens</i>	16 b
<i>L. perenne</i>	43 a
Suelo sin plantas	2 b
Suelo/Estiércol 1:1	58 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Lo anterior apoya la idea de que el suelo sin plantas no aporta suficientes nutrientes para permitir una buena sobrevivencia larval y que las larvas de este escarabeido no tienen la capacidad de utilizar el humus contenido en este tipo de suelo, o bien lo usan en forma limitada. No obstante lo anterior, se debe precisar que en todos los experimentos se utilizó un suelo harneado, desprovisto de raíces y otros restos de plantas, pero se encontraban mezcladas las capas superiores del mismo, lo que debe tenerse en consideración al extrapolar estos resultados a las condiciones de campo. Al respecto TATE (2000) señala que en estudios biológicos es importante precisar las características particulares del suelo así como considerar que existen diferencias entre el horizonte superior de suelo que en general contiene mayor cantidad de materia orgánica en relación a los horizontes inferiores. Teniendo presente estas limitantes, las diferencias entre larvas mantenidas en un suelo con escasos residuos vegetales y un suelo enmendado con una alta proporción de estiércol son obvias, lo que sugiere que estas larvas no son comedoras obligadas de raíces sino que pueden alimentarse de la materia orgánica en proceso de humificación y en ciertas ocasiones pueden completar sus requerimientos de nutrientes alimentándose de raíces vivas de plantas. Cabe señalar que al término de este experimento las larvas habían alcanzado el tercer estadio y aquellas mantenidas en raíces de ballica habían producido el corte de estas plantas a nivel de cuello.

Los resultados también indicarían que los requerimientos de las larvas de *P. herrmanni* podrían ser mayores en cuanto a nutrientes en el segundo y comienzo del tercer estadio, que posteriormente.

4.5.1.2 Variación de peso. Debido a la gran mortalidad larval en distintos tratamientos, sólo fue posible realizar un análisis parcial de la variación en el peso de las larvas, considerando

dos repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 21.

CUADRO 21 Variación de peso de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.

Tratamiento	Variación de peso (g)
<i>M. sativa</i>	0,128 ab
<i>T. subterraneum</i>	0,124 ab
<i>T. repens</i>	0,147 ab
<i>L. perenne</i>	0,192 ab
Suelo sin plantas	0,042 b
Suelo/Estiércol 1:1	0,311 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

Considerando que se eligieron al azar sólo dos repeticiones por tratamiento, para realizar un análisis estadístico, los resultados indican que la variación de peso es estadísticamente distinta y significativa entre las larvas que se mantuvieron con suelo sin vegetación en comparación a aquellas mantenidas en la mezcla suelo/estiércol. Aunque se necesitan nuevos datos experimentales que apoyen esta tesis, las diferencias en el tamaño de larvas observadas al momento de la cosecha y la medición del peso de las larvas eran obvias entre las que habían sido mantenidas en el suelo con la enmienda orgánica en comparación a las larvas mantenidas en suelo con plantas y el suelo sin plantas.

Estos resultados apoyan la idea que en general las raíces de diferentes especies no constituyen una fuente alimenticia óptima para las larvas de este escarabeido y que, al contrario, el

suministro de materia orgánica en forma de estiércol sí constituye un alimento adecuado para estas larvas. No se encontraron diferencias entre las distintas especies de plantas. La posibilidad de usar esta fuente alimenticia podría estar determinada por la capacidad de las larvas de metabolizar eficientemente las fibras constituyentes del estiércol por la asociación con organismos presentes en su intestino o bien a que la alta carga microbiana presente en el estiércol constituye una parte importante del suministro nutricional y energético para estas larvas. Con relación a esta temática, McQuillan y Webb, 1994, citados por LI y BRUNE (2005) han señalado que las larvas de muchas especies de insectos parecen prosperar exclusivamente en humus y desarrollarse normalmente en suelos desprovistos de raíces de plantas vivas. Esta no sería la situación, por lo menos con el suelo trumao utilizado en estos experimentos, por lo cual es necesaria la evaluación de cada uno de los componentes de la materia orgánica sea ésta humificada, no humificada y cada uno de los tipos de humus.

Observaciones microscópicas de pellets fecales de *C. zealandica* indicaron que las raíces de trébol eran más digeridas que las raíces de ballica (BAUCHOP y CLARKE, 1977). En el mismo estudio, estos autores concluyen que debido a que los carbohidratos estructurales sufren limitada digestión por las larvas del escarabeido, las larvas pueden requerir un gran volumen de material radical en su dieta, lo que explicaría su alto efecto destructivo en las praderas y su bajo efecto en la nutrición de las larvas.

La escasa sobrevivencia en alfalfa no puede ser explicada con estos ensayos debido a que no es posible determinar si las larvas murieron porque no se alimentaron de las raíces o su consumo les produjo la mortalidad. Algunos ejemplos del fenómeno de antixenosis y antibiosis que presenta la literatura en relación a larvas de escarabeidos han sido revisados por ROJAS

(1994). Para el caso de la alfalfa en particular, se ha señalado que las saponinas presentes en las raíces de esta planta forrajera actúan como inhibidores alimenticios para larvas de *C. zealandica* en Nueva Zelandia y que pudieran ser más de una las sustancias involucradas en esta inhibición (SUTHERLAND *et al.*, 1975 a, b), lo cual faltaría comprobar para el caso de las larvas de los escarabeidos nativos evaluados en estos experimentos.

4.5.2 Respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a la ausencia de raíces y a una enmienda orgánica en forma de estiércol en el suelo. Experimento 6. En este experimento se utilizaron materiales y métodos similares a los de los experimentos 3 y 4.

Al igual que en el experimento 5, en este experimento se evaluó la sobrevivencia y la variación de peso de las larvas, con la diferencia de que en este caso se colocó una larva en una maceta de menor tamaño. Esto con el fin de hacer un seguimiento individual del peso de cada una de las larvas en el sustrato correspondiente.

4.5.2.1 Sobrevivencia. La sobrevivencia de las larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol fueron estadísticamente distintos; los valores de sobrevivencia fueron en general similares a los del experimento 5, corroborando la importancia de la materia orgánica en el crecimiento de larvas de *P. herrmanni*.

La duración de este ensayo fue de 78 días, lo que indica que las larvas de segundo estadio de este insecto responden claramente a los estímulos alimenticios haciendo recomendable trabajar este tipo de ensayos con este estadio larval que presentó una activa alimentación durante un corto período.

CUADRO 22 Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* mantenidas individualmente en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin raíces y mezcla suelo/estiércol.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)
<i>M. sativa</i>	5,56 b
<i>T. subterraneum</i>	16,67 ab
<i>T. repens</i>	16,67 ab
<i>L. perenne</i>	27,78 ab
Suelo sin plantas	0,00 b
Suelo/Estiércol 1:1	61,11 a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($P < 0.05$).

A la fecha, los experimentos realizados con este escarabeido han usado larvas de tercer estadio, por ser consideradas la de mayor daño a las praderas. Sin embargo, dado estos resultados se puede inferir que ellas tienen un gran consumo y probablemente un período de activo crecimiento durante el segundo estadio larval y la parte inicial del tercero (PALMA, 2004).

4.5.2.2 Variación de peso. Esta evaluación no fue posible realizarla con los pesos promedios de las larvas, debido a que en el tratamiento con suelo sin plantas y con alfalfa se produjo una gran mortalidad, tal como fue mostrado en el Cuadro 22. A pesar de estas limitantes, es posible indicar que existe una diferencia muy clara a favor de la mezcla suelo/estiércol, aunque se sugiere repetir este tipo de ensayos con gran número de observaciones, tomando en cuenta la gran mortalidad que tienen estas larvas. Además, es necesario realizar ensayos más acabados a fin de determinar el rol que cumplen las diferentes fracciones y diferentes tipos de materia orgánica en el

desarrollo de las larvas y verificar si presentan mecanismos y/o microorganismos asociados que les permitan digerirlas.

Finalmente, los resultados de los experimentos 5 y 6 aceptan la hipótesis que las larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* presentan mayor peso y sobrevivencia en un suelo con una enmienda orgánica que en la presencia de raíces de distintas especies forrajeras y suelo desnudo.

5 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los diferentes experimentos y bajo las condiciones en que éstos fueron realizados se concluye lo siguiente.

Los fenoles totales, ácidos orgánicos (cítrico, málico, malónico, succínico y fumárico) y carbohidratos solubles totales exudados por las raíces de las especies forrajeras especies forrajeras *Lolium perenne*, *Trifolium subterraneum*, *T. repens* y *Medicago sativa* no tienen efecto sobre larvas de *H. elegans* ni de *P. herrmanni*.

Los análisis de los contenidos en fenoles totales, azúcares totales y ácidos orgánicos arrojaron concentraciones bajas en cada una de las evaluaciones, aunque fue posible detectar mayores niveles de las diferentes sustancias en los exudados de plantas cultivadas en condiciones hidropónicas.

Las larvas de *H. elegans* y *P. herrmanni* tienen un gran consumo y probablemente un período de activo crecimiento durante el segundo estadio larval y la parte inicial del tercero, lo que permite sugerir la utilización de estos estadios larvales en futuros ensayos.

Las larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* son capaces de mantenerse y alcanzar el estado adulto en suelo sin presencia de raíces, una vez que alcanzan un peso determinado a principios de mayo y no son afectadas positiva o negativamente por el riego con los exudados de raíces de *Lolium perenne*, *Trifolium subterraneum*, *T. repens*, *Medicago sativa* y suelo sin plantas, pudiendo alcanzar el estado adulto sin consumir tejido vegetal vivo.

El suelo tipo trumao serie Osorno sin plantas no aporta suficientes nutrientes que permitan una buena sobrevivencia larval o una variación de peso positiva y las larvas de *P. herrmanni* no tienen la capacidad de utilizar óptimamente el humus contenido en este tipo de suelo.

En general, las raíces de diferentes especies pratenses no constituyen una fuente alimenticia óptima para las larvas de *P. herrmanni*, las cuales crecen mejor en suelos con materia orgánica incorporada como estiércol donde predomina la fracción no humificada de la materia orgánica.

6 RESUMEN

Las larvas de escarabeidos son plagas nativas importantes en praderas del sur de Chile. Las dos especies más dañinas son *P. herrmanni* Germ. e *Hylamorpha elegans* (Burm.) (Col., Scarabaeidae), a pesar de esto existen pocos estudios de su interacción con el suelo y las plantas que ellas atacan. En condiciones de invernadero se realizaron cuatro experimentos a fin de establecer la respuesta medida en base a la sobrevivencia y variación de peso de larvas de tercer estadio de *H. elegans* y *P. herrmanni* a la aplicación a través del riego de los exudados solubles en agua percolados desde plantas de *Lolium perenne*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y testigos sin plantas. Las plantas fueron cultivadas en suelo y cultivos hidropónicos tanto en arena como en lana de vidrio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso ni sobrevivencia en ambas especies de escarabeidos debido probablemente a las reducidas cantidades de compuestos liberados por las raíces, lo cual fue confirmado mediante análisis HPLC en fase reversa a los exudados en sus contenidos de ácidos orgánicos (cítrico, málico, malónico, succínico y fumárico), fenoles solubles y azúcares solubles totales. Esta falta de respuesta pudo también deberse a que las larvas de tercer estadio utilizadas fueron poco afectadas, lo que sugiere hacer nuevos ensayos con larvas de segundo estadio.

En dos experimentos adicionales se midió la respuesta de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* a la presencia de raíces y a una enmienda orgánica en forma de estiércol de oveja al suelo en proporciones iguales en volumen. Se observó que las larvas fueron capaces de sobrevivir y crecer mejor en un suelo con estiércol, en comparación a un suelo desprovisto de vegetación.

7 SUMMARY

Grass grubs are important native pest to pasture in southern Chile. The two species that produce the major damage are *Hylamorpha elegans* (Burm.) and *Phytoloema herrmanni* Germ. (Col., Scarabaeidae), in spite of it few works exist about their interaction with soil and plant.

In greenhouse conditions, four experiments were carried out in order to test the response measured on the basis of the survival and weight variation of third instar larvae of *H. elegans* and *P. herrmanni* to the application of water soluble root exudates released by *Lolium perenne*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* and soil without plants. The plants were cultivated in soil and hydroponics cultures both in sand and glass wool. There were not statistically significant differences neither weight nor survival in both species of scarab grubs. It was probably due to the limited quantities of compounds liberated by the roots, which was confirmed by means of reverse phase HPLC analysis to the exudates in organic acids (citric, malic, malonic, succinic and fumaric) and total soluble phenols and sugars. This lack of response was also attributed to that the third instar larvae could be little affected, what suggests to do new trials with second instar larvae.

In two additional experiments were measured the response of second instar larvae of *P. herrmanni* to the absence of roots soil, presence of roots of *L. perenne*, *T. subterraneum*, *T. repens*, *M. sativa* and one organic amendment with sheep manure added to soil mixed in equal proportions of volume. Results showed that *P. herrmanni* larvae were capable of surviving and growing better in a soil with manure in comparison to a soil devoid of vegetation and pasture species.

8 BIBLIOGRAFÍA

- AGUILERA, A. y CISTERNAS, E. 1999. Gusano blanco y cuncunilla negra insectos que causan daños a la productividad de las praderas. *Agroanálisis* (Chile) Mayo : 35-37.
- ALBRECHT, K.; COWLES, R. y FUZY, E. 2003. Effects of turfgrass endophytes (Clavicipitaceae: Ascomycetes) on white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) larval development and field populations. *Environmental Entomology* 32(4): 895-906.
- ANAYA, A. y CRUZ-ORTEGA, R. 2001. La alelopatía: algunos estudios de caso y posibles aplicaciones. Pp: 61-67. In: ANAYA, A.; Espinoza-García, F. y CRUZ-ORTEGA, R. (Eds). *Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Primera edición. Plaza y Valdés. S.A. de C.V., México. 733p.
- ANDERSEN, D. 1987. Below-ground herbivory in natural communities: A review emphasizing fossorial animals. *The Quarterly Review of Biology* 62(3): 261-286.
- ARTIGAS, J. 1994. *Entomología económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos)*. Vol. II. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 943p.
- AZIZ, N.; EL-FOULY, M.; EL-ESSAWY, A. y KHALAF, M. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. *Botany Bulletin Academic Sinica* 38: 33-39.

- BAIS, H.; WALKER, T.; STERMITZ, F.; HUFBAUER, R. y VIVANCO, J. 2002a. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (+)-catechin. A rhizosecretedracemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128: 1173-1179.
- BAIS, H.; PARK, S.; STERMITZ, F.; HALLIGAN, K y VIVANCO, J. 2002b. Exudation of fluorescent β -carboline from *Oxalis tuberosa* L. roots. *Phytochemistry* 61:539-543.
- BAIS, H.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. Y VIVANCO, J. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *SCIENCE* 301: 1377-1380.
- BARBER, D. y GUNN, K. 1974. The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *The New Phytologist* 73: 39-45.
- BAUCHOP, T. y CLARKE, R. 1977. Degree of plant root digestion by the larva of the beetle, *Costelytra zealandica* . *Journal of Insect Physiology* 23(1): 65-69.
- BECK, S. 1965. Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology* 10:207-232.
- BERNKLAU, E. y BJOSTAD, L. 1998 a. Behavioral Responses of first-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to carbon dioxide in a glass bead bioassay. *Journal of Economic Entomology* 91(2): 444-456.
- BERNKLAU, E. y BJOSTAD, L. 1998 b. Reinvestigation of host location by western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae): CO₂ is the only volatile attractant. *Journal of Economic Entomology* 91(6): 1331-1340.

- BESOAIN, E. 1985. Capitulo 1. Los Suelos. pp 23-106. In: Tosso, J. (Ed.). Suelos volcánicos de Chile. Talleres gráficos INIA, Santiago de Chile. 723p.
- BOGDANOV, S.; MARTIN, P. y LÜLLMANN, C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* (1997) Extra issue: 1-59.
- BONOMELLI, C.; HENRIQUEZ, C.; GIRAL, L. y BESCANSÁ, P. 2003. Disponibilidad de fósforo en un andisol, con distintas fuentes y dosis de fósforo, en condiciones controladas. *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)* 30(3): 187-195.
- BORIE, F. y RUBIO, R. 2003. Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana Botanica* 60(1): 69-78.
- BRANSON, T. 1982. Olfactory response of larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* to plant roots. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 31: 303-307.
- BROWN, V. y GANGE, A. 1990. Insect herbivory below ground. *Advances in Ecological Research* 20: 1-58.
- BUDIC-LETO, I. y LOVRIC, T. 2002. Phenolic acids and their content in white wines. *Food Technology and Biotechnology* 40 (3): 221-225
- CARRILLO, R.; PAPE, H.; NEIRA, M. y BALOCCHI, O. 2004. Distribución espacial de larvas de dos especies de escarabeidos nativos en respuesta a plantas cultivadas. *Revista Chilena de Entomología* 30 (1):59-64.

- CASWELL, E., TANG, C., DE FRANK, J. y APT, W. 1991. The influence of root exudates of *Chloris gayana* and *Tagetes patula* on *Rotylenchulus reniformis*. *Revue Nematologique*. 14(4): 581-587.
- CAWTHRAY, G. 2003. An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the análisis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *Journal of Chromatography A* 1011: 233-240.
- CISTERNAS, E. 1986. Descripción de los estados preimaginales de escarabeidos asociados a praderas antropogénicas de la zona sur de Chile. Tesis Lic. Agr., Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 119p.
- CISTERNAS, E. y CARRILLO, R. 2001. Pololo café de las praderas. Informativo Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Remehue N°24. s/p.
- CHAPMAN, R. 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 48:455-484.
- CHEFETZ, B.; TARCHITZKI, J.; DESHMUCK, H.; HATCHER, P. y CHEN, Y. 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society American Journal* 66: 129-141.
- CHUNG, I.; AHN, J. y YUN, S. 2001. Identification of allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa* L.) straw and their biological activity. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 815-819.

- CORCUERA, L. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry* 33: 741-747.
- CORONADO, P. y MARQUEZ, D. 1972. *Introducción a la entomología*. Limusa, México. 282p.
- CZARNOTA, M.; REX, P.; DAYAN, F.; NIMBAL, C. y WESTON, L. 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: A potent PIS inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. *Weed Technology* 15(4): 813-825.
- DAKORA, F. y PHILLIPS, D. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and soil* 245: 35-42.
- DAVIDSON, R. 1969. Influence of soil moisture and organic matter on scarab damage to grasses and clover. *Journal of Applied Ecology* 6: 237-246.
- DAVIDSON, R.; WENSLER, R. y WOLFE, V. 1970. Damage to ryegrass plants of different size by various densities of pruinose scarab (*Sericesthis geminata* (Coleoptera)). *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 10:166-171.
- DE PAULA, C.; CARDOSO, j.;EVANGELISTA, A. y ALMEIDA, I. 2003. ALELOPATIA E SUAS INTERACOES NA FORMACAO E MANEJO DE PASTAGENS. *Boletim agropecuario* N° 54.Universidade Federal de Lavras. 55p.
- DOANE, J., LEE, Y., KLINGLER, J. y WESTCOTT, N. 1975. The orientation response of *Ctenicera destructor* and other wireworms (Coleoptera: Elateridae) to germinating grain and to carbon dioxide. *Canadian Entomologist* 107: 1233-1252.

- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P. Y SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356.
- DURAN, L. 1952. Aspectos ecológicos de la biología del San Juan verde, *Hylamorpha elegans* (Burm.) y mención de las demás especies de escarabeidos perjudiciales en Cautín. *Agricultura Técnica* (Chile) 12: 24-36.
- DURAN, L. 1954. La biología del *Phytoloema herrmanni* Germ. Y mención de otros escarabeidos perjudiciales a la agricultura en las provincias australes de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* (Chile) 54: 5-20.
- DURAN, L. 1976. Problemas de la entomología agrícola en Chile austral. *Agro Sur* (Chile) 4: 119-127.
- DURAN, M. 2002. Determinación del daño causado por *Hylamorpha elegans* (Burmeister) en trigo *Triticum aestivum* L. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 77p.
- EBANA, K.; YAN, W.; DILDAY, R.; NAMAI, H. y OKUNO, K. 2001. Variation in the Allelopathic Effect of Rice in the Water Soluble extracts. *Agronomy Journal* 93: 12-16.
- EINHELLIG, F. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal* 88: 886-893.
- EISSENSTAT, D. y YANAI, R. 1997. The Ecology of Root Lifespan. *Advances in Ecological Research* 27: 1-60.

- ETCHEVERRY, M y HERRERA, J. 1972. Curso teorico-práctico de entomología. Ed. Universitaria, Chile. 385p.
- FARREL, J. y SWENEY, 1972. Plant resistance to the white grub *Costelytra zealandica* (Col., Scarabaeidae) I. Resistance in pasture legumes. New Zealand Journal of Agricultural Research 15: 904-908.
- FARREL, J. y SWENEY, 1974a. Plant resistance to the grass grub *Costelytra zealandica* (Col., Scarabaeidae). 2. Screening for resistance in grasses. New Zealand Journal of Agricultural Research 17: 63-68.
- FARREL, J. y SWENEY, 1974b. Plant resistance to the grass grub *Costelytra zealandica* (Col., Scarabaeidae). 1. Resistance in *Lotus* and *Lupinus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 17: 69-72.
- FRESARD, M. 1992. Aspectos biológicos de *Hylamorpha elegans* Burm. y fitofagia de dos especies de escarabeidos en plantas de trigo. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 145p.
- GALBREATH, R. 1988. Orientation of grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) to a carbon dioxide source. New Zealand Entomologist 11: 6-7.
- GAYNOR, D.; LANE, G.; BIGGS, D. y SUTHERLAND, O. 1986. Measurement of grass grub resistance of bean in a controlled environment. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 14: 77-82.

- GRZYBOWSKI, W. y DUDZINSKA, M. 2004. Influence of humic substances on results of the spectrophotometric (TPTZ) analysis of monosaccharides. *Oceanologia* 46(3): 419-426
- GNANASUNDERAM, C. y SUTHERLAND, O. 1986. Hiptagin and other aliphatic nitroesters in *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* 25: 409-410.
- GODFREY, L.; YEARGAN, K. y MOUNTIFERING, R. 1987. Digestibility, protein content and nutrient yields of alfalfa stressed by early season insect pests and diseases. *Journal of Economic Entomology* 80:257-262.
- GONZALEZ, R. 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Ograma, Santiago de Chile. 310p.
- GREENLAND, D. 1965. Interaction between clays and organic compounds in soils. Part II. Absorption of soil organic compounds and its effect on soil properties. *Soils and Fertilizers* 28: 521-532.
- GREENLAND, D. y OADES, J. 1978. Chapter 2. Saccharides. Pp 213-261. *In: Giesecking (Ed.). Soil components. Volume I. Organic compounds. Springer-Verlag, New York, USA. 534p.*
- HÄKKINEN, S. 2000. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. 92p.
- HALLAK, A.; DAVIDE, L y SOUZA, I. 1999. Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.)root. *Genetics and Molecular Biology* 22(1): 95-99.

- HENRY, A. 2003. Effect of drought, flooding, and potassium stress on the quantity and composition of root exudates in axenic culture. Thesis Master of Science. Logan, Utah. Utah State University. 172p.
- HEREDIA, W.; PEIRANO, P.; BORIE, G. y AGUILERA, G. 2002. Soil organic matter-metal interactions in Chilean volcanic soils under different agronomic management. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33:2038-2099.
- HUANG, W.; LIN, C.; HUANG, M. Y WEN, K. 2002. Determination of α -Hydroxyacids in Cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(2): 95-100.
- HUNTER, M. 2001. Out of sight, out of mind: the impacts of root-feeding insects in natural and managed systems. *Agricultural and Forest Entomology* 3:3-9.
- HUYGENS, D.; BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, O.; OYZÚN, C. y GODOY, R. 2005. Aggregate and soil organic carbon dynamics in South Chilean Andisols. *Biogeosciences* 2: 159-174.
- INDERJIT. 1996. Plant Phenolics in Allelopathy. *The Botanical Review* 62(2): 186-202.
- JI, R. y BRUNE, A. 2004. Digestión of peptidic residues in humic substances by an álcali-stable and humic-acid-tolerant proteolytic activity in the gut of soil-feeding termites. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1648-1655.
- JONES, O. y COAKER, T. 1978. A basis for host plant finding in phytophagous larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 272-284.

- KAIN, W. y ATKINSON, D. 1977. Development of resistant pasture and methods of pasture management for grass grub (*Costelytra zealandica* (White)) control. New Zealand Journal of Agricultural Research 20: 507-517.
- KATO-NOGUCHI, H. 2004. Allelopathic substance in rice root exudates: Rediscovery of momilactone B as an allelochemical. Journal of Plant Physiology 161(3): 271-276.
- KRUSE, M. ; STRANDBERG, M. y STRANDBERG, B. 2000. Ecological effects of allelopathic plants a review. Department of Terrestrial Ecology NERI Technical Report N° 315. 64p.
- LADD, J. 1988. Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): Influence of sugars on feeding response of larvae. Journal of Economic Entomology 81:1390-1393.
- LANE, G.; BIGGS, D.; RUSSELL, G.; SUTHERLAND, O.; WILLIAMS, E.; MAINDONALD, J. y DONNELL, D. 1985. Isoflavonoid feeding deterrents for *Costelytra zealandica*. Structure-Activity Relationships. Journal of Chemical Ecology 11(12): 1713-1735.
- LEMKE, T.; STING, U.; EGERT, M.; FRIEDRICH, M. Y BRUNE, A. 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology 69(11): 6650-6658.

- LI, X. 2004. Transformation and mineralization of organic matter by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fachbereich Biologie, Universität Konstanz. Konstanz. 135 p. In : <http://www.ub.uni-konstanz.de/kops/volltexte/2004/1410/> 20-mayo-2005.
- LI, X. y BRUNE, A. 2005a. Digestion of microbial biomass, structural polysaccharides, and protein by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biology & Biochemistry* 37: 107-116.
- LI, X. y BRUNE, A. 2005b. Selective digestion of the peptide and polysaccharide components of synthetic humic acids by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1476-1483.
- LIPTON, D.; BLANCHAR, R. y BLEVINS, D. 1987. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* 85: 315-317.
- MÁŠAR, M.; KANIANSKY, D.; BODOR, R.; JÖHNCK, M. y STANISLAWSKI, B. 2001. Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachopheresis on a planar chip. *Journal of Chromatography A* 916: 167-174.
- MCKEY, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. In: Rosenthal, G. y Janzen, D (Eds). *Hervibores-Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Pp 88-133. Academic Press, London.

- NORAMBUENA, H. y AGUILERA, A. 1988. Plagas de las praderas. pp 229-250. In: Ruiz, I (Ed). Praderas para Chile. Alfabetta, Santiago de Chile. 723p.
- OHNO, T. y DOOLAN, K. 2001. Effects of red clover decomposition on phytotoxicity to wild mustard seedling growth. Applied Soil Ecology 16: 187-192.
- OLALQUIAGA, G. 1961. Plagas de forrajeras en Chile. Planos de infestación y control. Agricultura Técnica (Chile) 21:108-118.
- OLOFSDOTTER, M. 2001. Rice- A step toward use of allelopathy. Agronomy Journal 93: 3-8.
- PALMA, R. 2004. Relaciones entre densidades larvales de *Hylamorpha elegans* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae), y el establecimiento y desarrollo de la especie pratense *Lolium perenne* L. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 82p.
- PAPE, H. 2001. Respuesta de larvas de dos escarabeidos nativos a plantas cultivadas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 59p.
- PRASAD, R. y POWER, J. 1997. Soil Fertility Management for Sustainable Agricultura. Lewis Publishers, Boca Raton, New York. 356p.
- PRESTIDGE, R.; VAN DER ZIJPP, S. y BADAN, D. 1985. Effects of plant species and fertilizers on grass grub larvae *Costelytra zealandica*. New Zealand Journal of Agricultural Research 28: 409-417.

- RADCLIFFE, J. 1970. Some effects of grass grub (*Costelytra zealandica* (White)) larvae on pasture plants. New Zealand Journal of Agricultural Research 13:87-104.
- RADCLIFFE, J. 1971. Effects of grass grub (*Costelytra zealandica* White) larvae on pasture plants. I. Effects of grass grub and nutrients on perennial ryegrass. New Zealand Journal of Agricultural Research 14:597-606.
- RAMOS, G.; FRUTOS, P.; GIRALDEZ, F. y MANTECON, A. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Archivos de Zootecnia 47:597-620.
- RICE, E. 1984. Allelopathy. New York. USA. 2nd ed. Academic Press. 422p.
- RIDS DILL-SMITH, T. 1977. Effects of root-feeding by scarabeid larvae on growth of perennial ryegrass plants. Journal of Applied Ecology 14:73-80.
- RITCHER, P. 1958. Biology of Scarabaeidae. Annual Review of Entomology 3:311-334.
- RITCHER, P. 1966. White grubs and their allies. A study of North American Scarabaeoid larvae. Univ. Press. Corvallis, Oregon. 219p.
- RIVERA, M. 1904. Biología de dos coleopteros chilenos cuyas larvas atacan al trigo. Revista Chilena de Historia Natural (Chile) 8:241-254.

- ROBINSON, A. 1995. Optimal release rates for attracting *Meloidogyne incognita*, *Rotylechulus reniformis*, and other nematodes to carbon dioxide in sand. *Journal of Nematology* 27(1): 42-50.
- ROJAS, E. 1994. Estudio de las relaciones entre distintas densidades larvales de escarabeidos y diferentes especies pratenses. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 135p.
- ROSENTHAL, G. y JANSEN, D. 1979. Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, Inc. New York. 718p.
- RUSSELL, G.; SUTHERLAND, O.; LANE, G. y BIGGSS, D. 1979. Is there a common factor for insect and disease resistance in pasture legumes?. pp:95-97. In: Crosby , T. y Pottinger, R.(Eds). *Proceedings of the 2nd Australasian Conference of on Grassland Invertebrate Ecology*. Government Printer, Wellington. 294p.
- RUSSELL, G.; SHAW, G.; CHRISTMAS, P.; YATES, M. y SUTHERLAND, O. 1984. Two 2-arylbenzofurans as insect feeding deterrents from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Phytochemistry* 23 (7): 1417-1420.
- SAXENA, D.; FLORES, S. y STOTZKY, G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. 1999. *Nature* 402: 480.
- SCHLATTER, J.; GREZ, R. y GERDING, V. 2003. Manual para el reconocimiento de suelos. Instituto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. Impresión América Ltda. Valdivia, Chile. 114p.

- SEIGLER, D. y PRICE, P. 1976. Secondary compounds in plants: Primary functions. *American Naturalist* 110:101-104.
- SEIGLER, D. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal* 88: 876-885.
- SIMONDS, M. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56:245-252.
- SIMONDS, M. 2003. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64:21-30.
- STRNAD, S., BERGMAN, M. y FULTON, W. 1986. First-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) response to carbon dioxide. *Environmental Entomology* 15: 839-842.
- STURZ, A. y CHRISTIE, B. 2003. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research* 72: 107-123.
- SULLIVAN, T. 2004. Interactions between soil microbial communities and plant roots: A minireview. 16p. In: http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/Courses/en570/papers_2004/sullivan.Pdf
- SURBER, A. 2002. Efecto de diferentes densidades de *Phytoloma herrmanni* Germ. sobre plantas de trigo, sembradas en dos épocas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 72p.

- SUTHERLAND, O. 1971. Feeding behaviour of the grass grub *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Melolonthinae). 1. The influence of carbohydrates. New Zealand Journal of Science 14: 18-24.
- SUTHERLAND, O. 1972. Olfactory responses of *Costelytra zealandica* (coleoptera: Melolonthinae) larvae to grass root odours. New Zealand Journal of Science 15: 165-172.
- SUTHERLAND, O y HILLIER, J. 1974a. Feeding behavior of the grass grub *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Melolonthinae)3. The influence of amino acids, ascorbic acid, and inorganic salts. New Zealand Journal of Zoology 1:211-216.
- SUTHERLAND, O y HILLIER, J. 1974b. Olfactory responses of *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Melolonthinae) to roots of several pasture plants. New Zealand Journal of Zoology 1:365-369.
- SUTHERLAND, O.; HOOD, N. y HILLIER, J. 1975a. Lucerne root saponins as feeding deterrent for grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in the root of a resistant pasture plant *Lotus pedunculatus*. New Zealand Journal of Zoology 2:509-512.
- SUTHERLAND, O.; MANN, J. y HILLIER, J. 1975b. Feeding deterrents for the grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). New Zealand Journal of Zoology 2:93-100.

- SWIDEREK, K.; ALPERT, A.; HECKENDORF, A.; NUGENT, K. y PATTERSON, S. 1997. Structural analysis of proteins and peptides in the presence of detergents: Tricks of the trade. In: <http://www.abrf.org/> 03/08/06.
- TAN, K. 1998. Principles of soil chemistry. Third edition. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.521p.
- TATE, R. 2000. Soil Microbiology. Second edition, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.508p.
- TISDALL, J. y OADES, J. 1980 . Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. Australian Journal of Soil Research 17(3): 429-441.
- TU, S.; MA, L. y LUONGO, T. 2004. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. Plant and Soil 258: 9-19.
- TÜZEN, M. y ÖZDEMİR, M. 2003. Chromatographic determination of phenolic acids in the snowdrop by HPLC. Turkish Journal of Chemistry 27:49-54.
- VAN DEN BOSCH, J.; CARADUS, J.; LANE, G.; GAYNOR, D.y DYMOCK, J. 1995. Screening white clover for resistance to grass grub in a controlled environment. New Zealand Journal of Agricultural Research 38: 329-336.
- VAN DER PUTTEN, W. 2002. Plant defense below ground and spation temporal proceses in natural vegetation. Ecology 84 (9):2269-2280.

- VILLANI, M. y WRIGHT, R. 1990. Environmental influences on soil macroarthropod behavior in agricultural systems. Annual Review of Entomology 35: 249-269.
- VIVANCO, J. y BAIS, H. 2004. Unraveling the hidden potential of root exudates: from allelochemicals to antibiotics. (Abstracts 23004) In: <http://lamar.colostate.edu/~jvivanco>
- WALKER, T.; BAIS, H.; GROTEWOLD, E. y VIVANCO, J. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology 132: 44-51.
- WANG, Y.; KHOO, K.; CHEN, S.; LIN, C.; WONG, C. y LIN, C. 2002. Studies on the immuno modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: Functional and Proteomic analyses of the fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry 10: 1057-1062.
- WEIL, R.; ISLAM, R.; STINE, M.; GRUBER, J. Y SAMSON-LIEBIG, S. 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. American Journal of Alternative Agriculture 18 (1): 3-17.
- WEIR, T.; PARK, S. y VIVANCO. 2004. Biochemical and Physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Current Opinion in Plant Biology 7:472-479.
- ZAGAL, E. y CÓRDOBA, C. 2005. Indicadores de calidad de la materia orgánica del suelo en un andisol cultivado. Agricultura Técnica (Chile) 65(1): 186-197.

- ZAGAL, E.; LONGERI, L.; VIDAL, I.; HOFFMAN, G. y GONZÁLEZ, R.
Influencia de la adición de nitrógeno y fósforo sobre la
descomposición de paja de trigo en un suelo derivado de
cenizas volcánicas. Agricultura Técnica (Chile) 63(4):403-
415.
- ZENG, R.; LUO, S.; SHI, Y.; SHI, M y TU, C. 2001. Physiological
and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F
on higher plants. Agronomy Journal 93: 72-79.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, M.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M. Y
MARTIN, J. 1982. Bioquímica de suelos derivados de cenizas
volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con las
propiedades físico-químicas de ellos. Agricultura Técnica
(Chile) 42(1): 67-72.
- ZUNINO, H. y BORIE, F. 1985. Capítulo 5. Materia orgánica y
procesos biológicos en suelos alofánicos. pp 433-490. In:
Tosso, J. (Ed.). Suelos volcánicos de Chile. Talleres
gráficos INIA, Santiago de Chile. 723p.

ANEXOS

ANEXO 1 Análisis de varianza de la sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	1,71831	4	0,429578	0,08	0,9873
Error	233,868	45	5,19707		
Total	235,586	49			

ANEXO 2 Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,00101	4	0,000253	0,71	0,5913
Error	0,01463	41	0,000357		
Total	0,01564	45			

ANEXO 3 Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (primera evaluación).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	3,24202	5	0,6484	0,84	0,5253
Error	41,5351	54	0,7692		
Total	44,7771	59			

ANEXO 4 Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (segunda evaluación).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	6,4292	5	1,2858	0,95	0,456
Error	72,9682	54	1,3513		
Total	79,3974	59			

ANEXO 5 Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (primera evaluación).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,0009	5	0,00018	0,61	0,6959
Error	0,0162	54	0,00029		
Total	0,0171	59			

ANEXO 6 Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde diferentes especies pratenses y suelo sin plantas (segunda evaluación).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,0020	5	0,0004	1,48	0,2126
Error	0,0148	54	0,0003		
Total	0,0168	59			

ANEXO 7 Análisis de varianza de la sobrevivencia total final de larvas de tercer estadio de *P. herrmannii*. Experimento 2.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,9692	5	0,1938	2,13	0,0763
Error	4,9255	54	0,091		
Total	5,89	59			

ANEXO 8 Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de *P. herrmannii* en suelo con raíces, sin raíces y mezcla suelo/estiércol

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	281,261	5	56, 2522	20,70	0,0000
Error	146,768	54	2,71793		
Total	428,029	59			

ANEXO 9 Análisis de varianza de la variación de peso de larvas de segundo estadio de *P. herrmannii* en suelo con raices, sin raíces y mezcla suelo/estiércol

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,02996	5	0,00599	4,78	0,0416
Error	0,00753	6	0,00125		
Total	0,03749	11			

ANEXO 10 Análisis de varianza de la sobrevivencia larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces, sin raíces y mezcla suelo/estiércol (Experimento 5)

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,02996	5	0,00599	4,78	0,0416
Error	0,00753	6	0,00125		
Total	0,03749	11			

ANEXO 11 Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,92071	4	0,2302	5,00	0,054
Error	0,22999	5	0,0459		
Total	1,15070	9			

ANEXO 12 Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	13,4544	5	2,69087	24,46	0,0006
Error	0,659992	6	0,10999		
Total	14,1144	11			

ANEXO 13 Análisis de varianza de los azúcares liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas.

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	4,7231	5	0,944619	19,13	0,0013
Error	0,296197	6	0,0493661		
Total	5,01929	11			

ANEXO 14 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas (17/03/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,06561	4	0,0164	2,43	0,1779
Error	0,03370	5	0,0067		
Total	0,09931	9			

ANEXO 15 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena(17/03/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,0282376	4	0,0071	1,51	0,3265
Error	0,0233545	5	0,0046		
Total	0,0515921	9			

ANEXO 16 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio(17/03/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,07365	4	0,01841	3,17	0,1186
Error	0,02901	5	0,00580		
Total	0,10266	9			

ANEXO 17 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas(20/04/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,01382	4	0,00345	3,74	0,0901
Error	0,00462	5	0,00092		
Total	0,01844	9			

ANEXO 18 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena (20/04/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,168687	4	0,0422	12,61	0,008
Error	0,016727	5	0,0033		
Total	0,185414	9			

ANEXO 19 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (20/04/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,00866	4	0,0021	1,88	0,2515
Error	0,00575	5	0,0011		
Total	0,01441	9			

ANEXO 20 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en suelo y suelo sin plantas(23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,035937	4	0,00898	3,42	0,105
Error	0,013131	5	0,00262		
Total	0,049068	9			

ANEXO 21 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,275456	5	0,05509	5,53	0,03
Error	0,0597265	6	0,00995		
Total	0,335182	11			

ANEXO 22 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,684745	5	0,136949	28,86	0,0004
Error	0,028473	6	0,004745		
Total	0,713218	11			

ANEXO 23 Análisis de varianza de los fenoles liberados por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,275456	5	0,05509	5,53	0,03
Error	0,0597265	6	0,00995		
Total	0,335182	11			

ANEXO 24 Análisis de varianza del ácido cítrico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	1,29957	5	0,2599	0,90	0,54
Error	1,73353	6	0,2889		
Total	3,0331	11			

ANEXO 25 Análisis de varianza del ácido fumárico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,00015	5	0,000030	0,80	0,587
Error	0,00023	6	0,000038		
Total	0,00038	11			

ANEXO 26 Análisis de varianza del ácido malónico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	3,6906	5	0,7381	0,75	0,616
Error	5,9202	6	0,9867		
Total	9,6108	11			

ANEXO 27 Análisis de varianza del ácido succínico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en arena y suelo sin plantas (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	8,03004	5	1,60601	1,00	0,489
Error	9,63605	6	1,60601		
Total	17,6661	11			

ANEXO 28 Análisis de varianza del ácido cítrico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	3,83240	5	0,766	0,91	0,531
Error	5,05417	6	0,842		
Total	8,88657	11			

ANEXO 29 Análisis de varianza del ácido fumárico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,0002	5	0,00004	0,82	0,578
Error	0,0003	6	0,00005		
Total	0,0005	11			

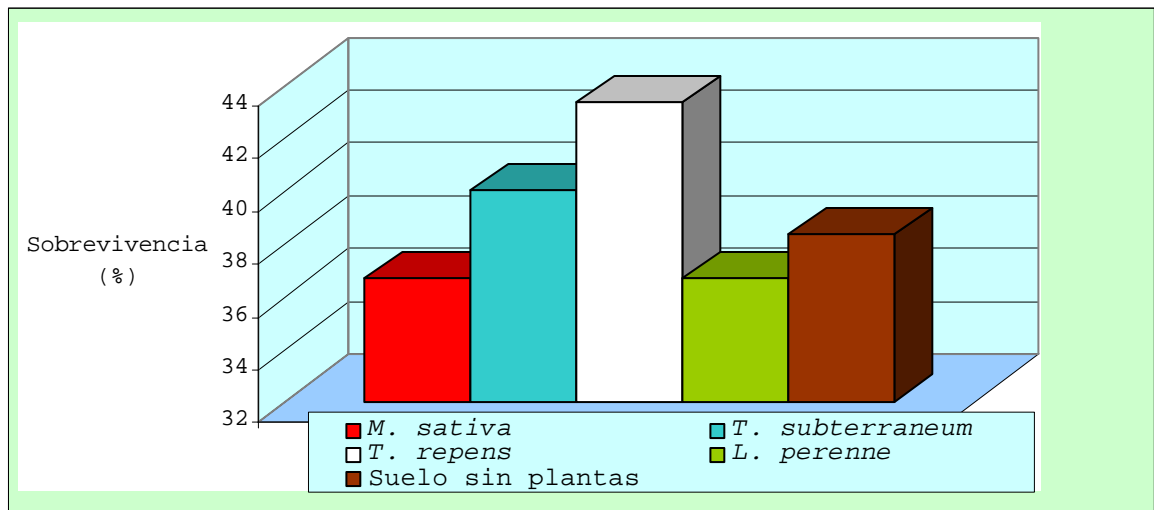
ANEXO 30 Análisis de varianza del ácido málico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	0,1680	5	0,0336	1,00	0,489
Error	0,2016	6	0,0336		
Total	0,3696	11			

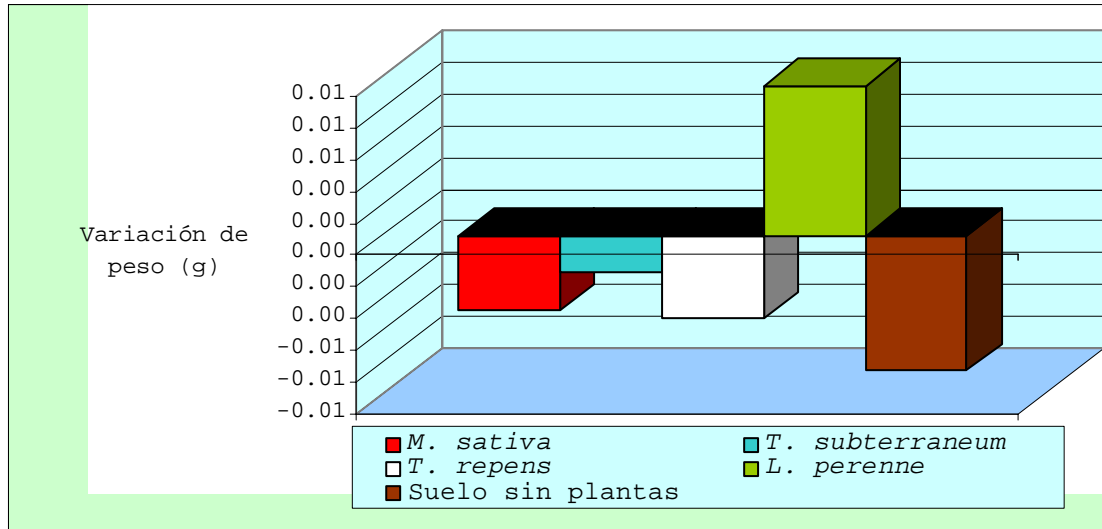
ANEXO 31 Análisis de varianza del ácido malónico liberado por las raíces de distintas especies pratenses cultivadas en lana de vidrio (23/07/04).

FV	SC	GL	CM	F. calc.	F. prob.
Tratamiento	7,9111	5	1,5822	1,22	0,403
Error	7,8023	6	1,3004		
Total	15,7134	11			

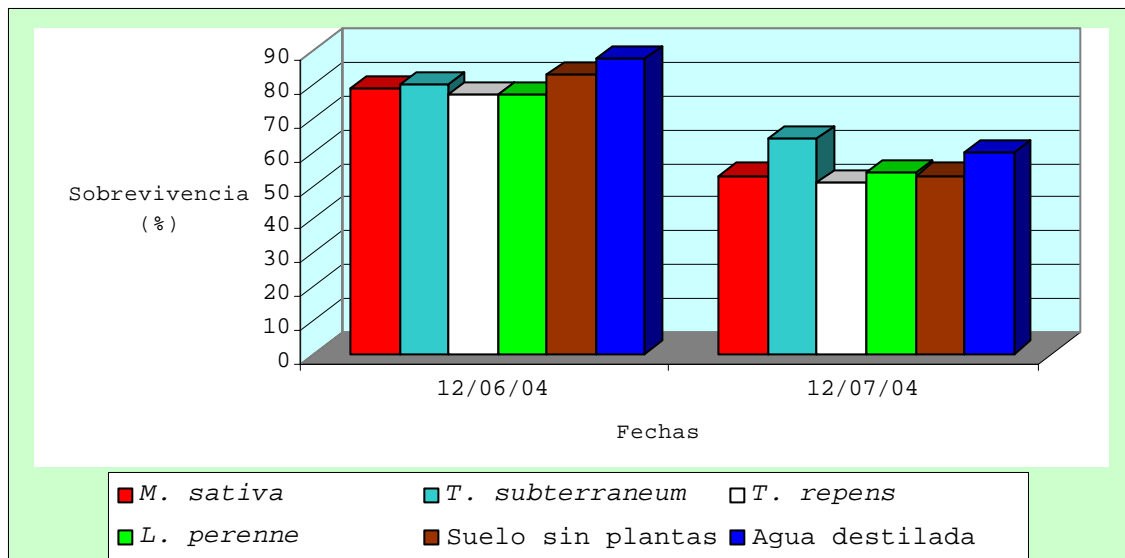
ANEXO 32 Supervivencia de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con exudados solubles de plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.



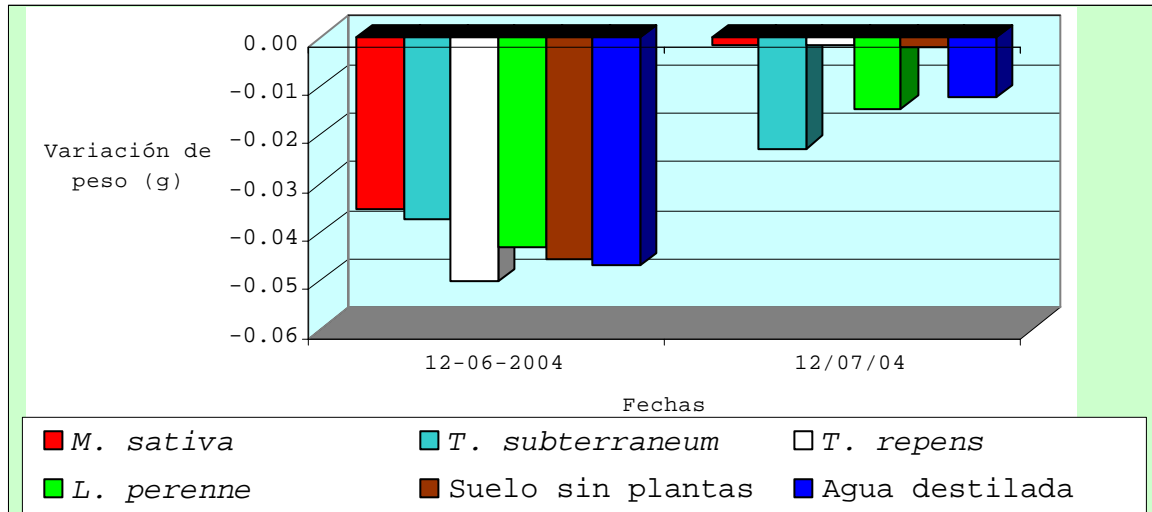
ANEXO 33 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *H. elegans* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses y suelo sin plantas.



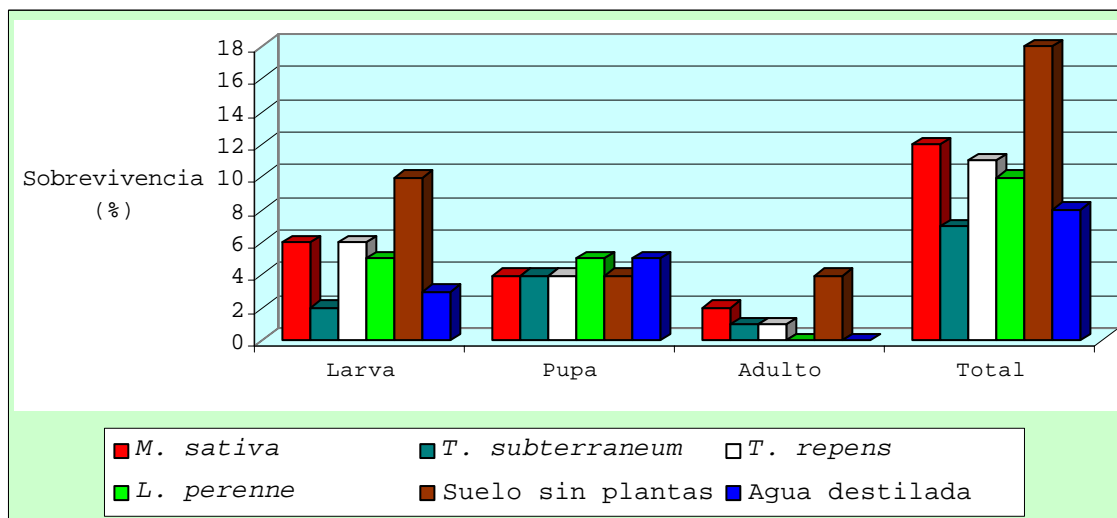
ANEXO 34 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con exudados solubles desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.



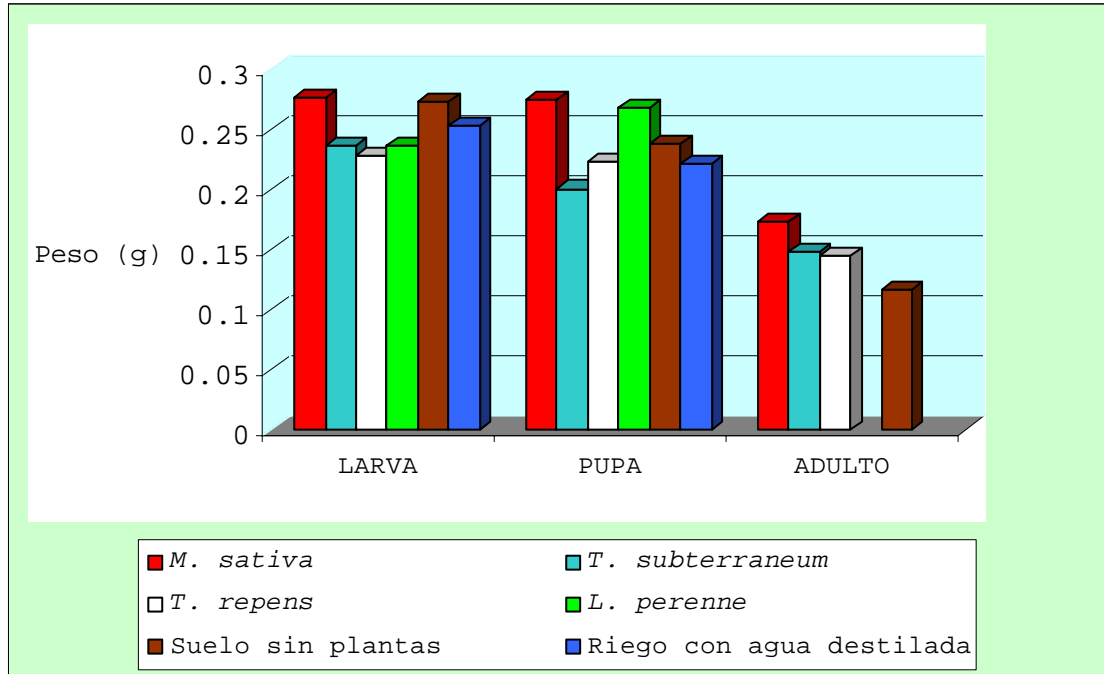
ANEXO 35 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada en dos fechas de evaluación.



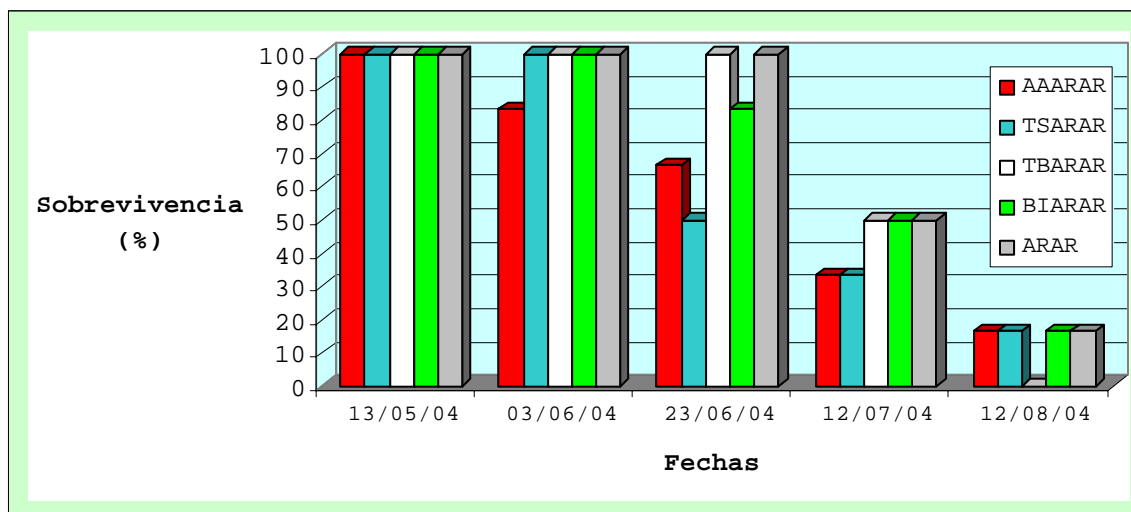
ANEXO 36 Sobrevivencia final de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en suelo sin vegetación, regado con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses, suelo sin plantas y agua destilada.



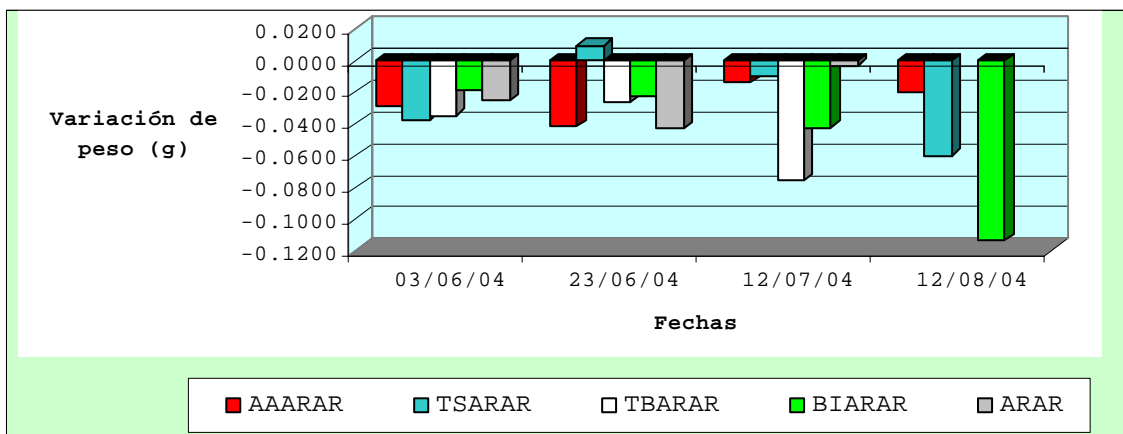
ANEXO 37 Peso final por estado de desarrollo de *P. herrmanni*



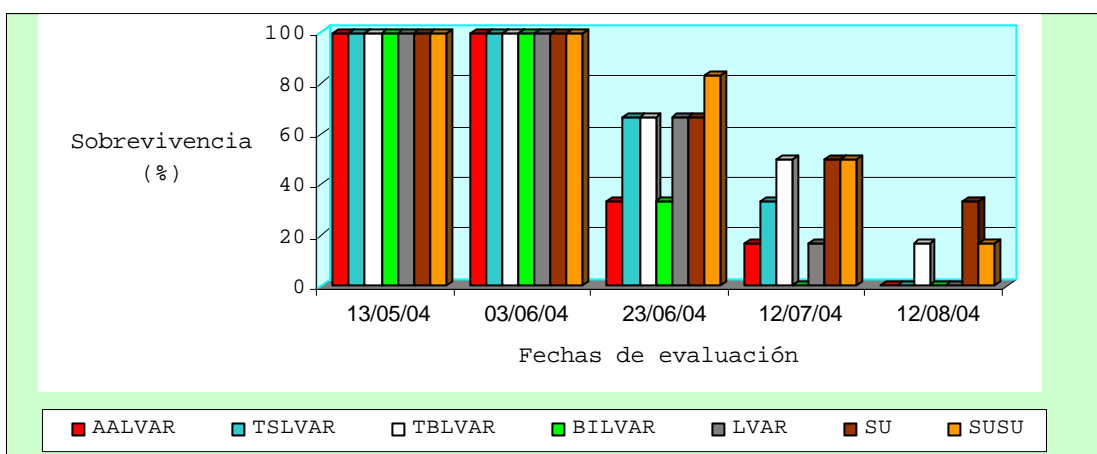
ANEXO 38 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.



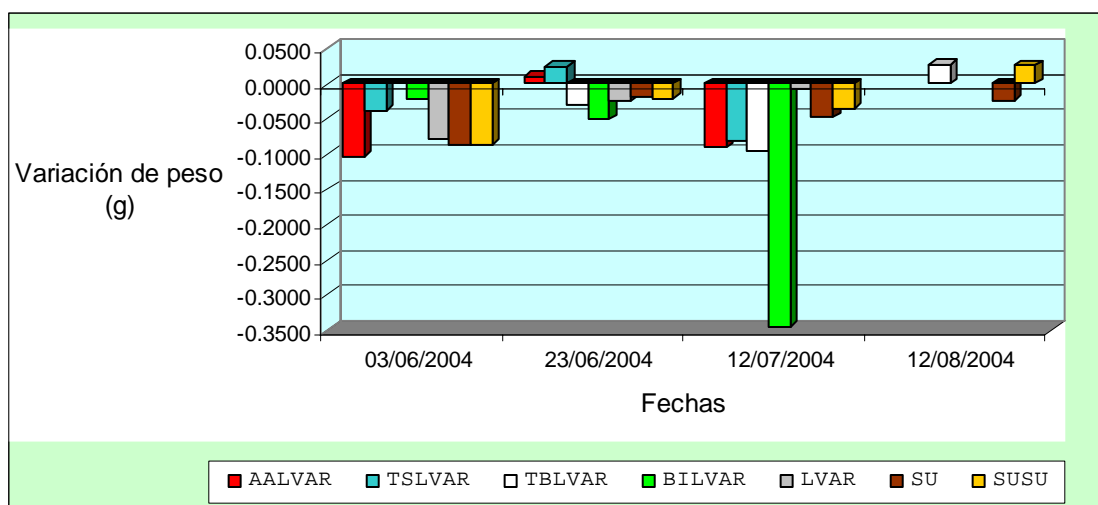
ANEXO 39 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena regada con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en arena y arena sin cultivo.



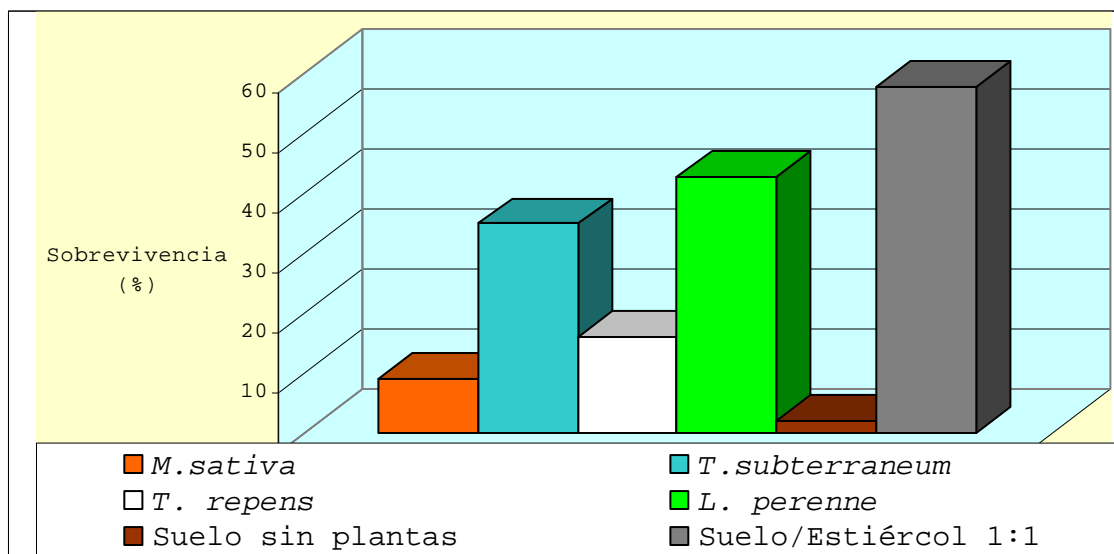
ANEXO 40 Sobrevivencia de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo



ANEXO 41 Variación de peso de larvas de tercer estadio de *P. herrmanni* en arena y suelo regados con el agua percolada desde macetas con plantas de diferentes especies pratenses cultivadas en lana de vidrio, suelo sin plantas y lana de vidrio sin cultivo



ANEXO 42 Sobrevivencia de larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin plantas y mezcla suelo/estiércol.



ANEXO 43 Variación de peso larvas de segundo estadio de *P. herrmanni* en suelo con raíces de plantas de distintas especies pratenses, suelo sin plantas y mezcla suelo/estiércol.

