

Evaluación de la patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de *Cosmopolites sordidus*

Reina C. Medina L., Galo A. Salcedo R. y Érika E. Tapia R.²

Introducción

La necesidad de disminuir el excesivo número de aplicaciones de insecticidas por sus efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana ha inducido a buscar otras alternativas en el combate a insectos-plaga, como es el uso de agentes de control biológico. Existen varias razones que limitan la aceptación por el agricultor el control biológico; entre ellas: los controladores biológicos son de lenta acción, el agricultor no ve resultados inmediatos, no son de fácil aplicación a diferencia de los pesticidas químicos.

Actualmente, ha crecido el interés por hacer investigación en el control biológico y los resultados que se han obtenido son escasos aunque las perspectivas son enormes. Al respecto el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias y el Centro Internacional de la Papa han aislado e identificado 28 poblaciones de nematodos entomopatógenos. La mayor parte corresponden a aislamientos de cultivo de papa en rotación con otro cultivo (Hernández *et al.*, 2006).

La especie *Heterorhabditis bacteriophora*, tiene una estrategia activa de búsqueda de sus hospederos. La mayoría de los nematodos con esta estrategia tienden a ser altamente móviles y responden a los estímulos químicos del hospedero y están adaptados a insectos menos móviles en el suelo. Pueden ser multiplicados in vivo en un insecto hospedero como *Galleria mellonella* que habita en las colmenas de abejas (Gaugler, 1988). La producción masiva de *Galleria mellonella* no necesita requerimientos especiales; una larva puede producir hasta 200.000 juveniles infectivos de nematodos (Kaya, 1993). En la literatura se plantea que los rendimientos alcanzados por *Heterorhabditis bacteriophora* pueden alcanzar 50.000 a 400.000 juveniles/larva de *Galleria mellonella* (Flanders *et al.*, 1996).

El *Heterorhabditis bacteriophora* introduce una bacteria simbiote denominada *Photorhabdus* en la cavidad del insecto, la cual destruye sus tejidos internos creando un medio favorable para alimentarse y reproducirse (Sepúlveda *et al.*, 2004). Son los únicos patógenos de insectos con un amplio rango de hospederos que incluye a la mayoría de los órdenes de insectos y pueden ser multiplicados artificialmente a gran escala en medio líquido o sólido (Reyes, 2003). Sin embargo, el uso de nematodos entomopatógenos para el control de plagas es escaso pero por su efectividad en el control de insectos-plaga debe difundirse el empleo de esta tecnología, para que sea conocida y más ampliamente investigada y utilizada. Los

² Universidad de Guayaquil, Vinces-Ecuador.

objetivos del presente estudio fueron: Establecer el protocolo para la multiplicación del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*, determinar el grado de patogenicidad del nematodo en larvas de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) a nivel de laboratorio y difundir los resultados de la investigación a los agricultores y estudiantes.

Metodología

El estudio se realizó en el Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces, de la Universidad de Guayaquil, localizado en el kilómetro 1.5 de la vía Vinces-Palestina, región con una temperatura promedio de 25.4° C y una precipitación anual de 1.400 mm de lluvia y humedad relativa del 84%.

Establecimiento del protocolo de reproducción del nematodo

Infección. Para la multiplicación del nematodo se dispuso de larvas de *Galleria mellonella*, *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda*, en un total de 50 larvas de cada una. Se dividieron en grupos de 10 y se colocaron en Caja Petri. Se preparó un inóculo de nematodos con juveniles infectivos recién emergidos y obtenidos según la técnica de cultivo de nematodos sobre *Galleria mellonella*, descrita por Kaya, 1993. Se añadió 10 ml de volumen del líquido a la caja con una pipeta. Posteriormente se adicionó agua destilada hasta humedecer uniformemente ambas superficies de las cajas, las que se cerraron y mantuvieron a una temperatura de 28° C. Después de cuatro días los cadáveres de larvas se separaron y fueron lavadas con agua destilada, luego fueron colocadas en la trampa White. Una vez que se obtuvo los nematodos de la cámara White se procedió a pasar por un tamiz número 500 (mesch) con el propósito de separar a los protozoarios que quedan retenidos en el tamiz. De esa manera queda el agua solo con los nematodos (cosecha). Finalmente, se procedió a almacenar el agua con nematodo en una funda de polietileno con una esponja envuelta con papel absorbente y en frascos ámbar y luego se los conservó a una temperatura de 10° a 12° C por 4 meses.

Determinación del grado de patogenicidad a nivel de laboratorio. El ensayo se realizó en Cajas Petri, con papel toalla en el fondo. Se añadió la suspensión de nematodos en las siguientes concentraciones (0, 1.000, 1.500, 2.000 y 2.500 nematodos/larva de *Cosmopolites sordidus* con quince repeticiones en cada caso. Se empleó suspensiones de la población, obtenidas en trampa White a partir de larvas de *Galleria mellonella* de 10 días de inoculadas. Una vez humedecido el papel toalla con agua destilada, se colocó una larva de picudo negro con un pedazo de pseudotallo fresco en cada Caja Petri, luego se taparon y se dejaron a temperatura ambiente de 28° C. Luego se realizaron observaciones a las 24, 48, 72 y 96 horas, se contaron y separaron las larvas muertas.

Análisis estadístico. Para establecimiento del protocolo de reproducción del nematodo entomopatógeno se utilizó el diseño completamente al azar teniendo como tratamientos *Galleria mellonella*, *Spodoptera frugiperda* y *Cosmopolites sordidus* más el testigo absoluto. Cada uno contó con 5 repeticiones para realizar la multiplicación, teniendo en cuenta una Caja Petri como unidad experimental y para la determinación de la patogenicidad del nematodo en larvas de picudo negro se realizó bajo un diseño de bloques al azar con 5 dosis (tratamientos) y 15 repeticiones, con un total de 75 unidades experimentales. Los datos

previos al Andeva fueron transformados a arco seno $\theta x + 1$ y se realizó la comparación de medias de los tratamientos utilizando Tukey 0.05 de probabilidad.

Resultados

Multiplicación del nematodo

Al realizar la comparación de medias entre los tratamientos hubo diferencias estadísticas indicando que el tratamiento *Galleria mellonella* presentó el mayor promedio de 271.524 nematodos, seguido del tratamiento *Cosmopolites sordidus* con un promedio de 146.857 nematodos y con menor promedio el tratamiento *Spodoptera frugiperda* con un promedio de 47.044 nematodos/larva. Estos resultados coinciden con los trabajos de Flanders (1996) quien afirma que los rendimientos de *Heterorhabditis bacteriophora* pueden alcanzar de 50.000 a 400.000 nematodos/larva de *Galleria mellonella*. De la misma manera, Kaya (1993) y Hernández (2006) afirman que este nematodo se multiplica en larvas de *Galleria mellonella* y no necesita de requerimientos especiales.

Los días de emergencia de los nematodos en las larvas *Galleria mellonella*, *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda* fue a los cinco días después de la infección de las larvas. La temperatura promedio para multiplicar el nematodo fue de 27° C con una humedad relativa de 71% a nivel del laboratorio. El tiempo empleado por las larvas de *Galleria mellonella* para producir nematodos es de 30 días, 18 días para *Cosmopolites sordidus* y 20 días para *Spodoptera frugiperda*. La sintomatología provocada por el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en los cadáveres de las larvas fue a las 48 horas, donde se manifestó una coloración café rojizo para el *Galleria mellonella* y café pardo para *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda*.

Determinación de la patogenicidad del nematodo

De acuerdo a la evaluación realizada a las 24 horas después de instalado el ensayo, no se detectó diferencia estadística entre las dosis (tratamientos) y repeticiones. De la misma manera, al realizar la comparación de medias Tukey < 0.05 (Tabla 1) no hubo diferencias estadísticas, pero fue evidente que las dosis de 1500 y 2000 nematodos a las 24 horas después de la aplicación obtuvieron mayores cantidades de larvas infectadas con un promedio de 0.27 que representa un porcentaje de 26.67. El coeficiente de variación fue de 22%.

Tabla 1
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad a las 24 y 48 horas

Dosis (tratamientos)	24 horas	48 horas
0 nematodos	0.00 a*	0.00 c
1000 nematodos	0.20 a	0.80 a
1500 nematodos	0.27 a	0.53 ab
2000 nematodos	0.27 a	0.40 bc
2500 nematodos	0.20 a	0.33 abc

*Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente bajo la prueba de Tukey < 0.05

Patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* a las 48 horas

De acuerdo a la evaluación realizada a las 48 horas después de instalado el ensayo, se detectó una diferencia altamente significativa entre las dosis (tratamientos), no así para las repeticiones, el coeficiente de variación fue igual a 25.22%. Al realizar las comparaciones de medias de los tratamientos se pudo observar que el mayor promedio de 0.80 que representa el 80% de mortalidad de larvas de picudo negro con el nematodo se obtuvo con la dosis de 1.000 nematodos seguido de las dosis de 1.500 nematodos con un promedio de 0.53 larvas muertas que representa 53% (tabla 1).

Patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* a las 72 horas

El realizar el análisis de varianza a las 72 horas después de instalado el ensayo se detectó diferencias altamente significativas entre las dosis (tratamientos) no así para los repeticiones donde su resultado fue no significativo. El coeficiente de variación fue de 22.49%.

Comparando los promedios de los tratamientos con la prueba de Tukey < 0.05 hubo diferencias estadísticas entre los promedios; la dosis de 1.000 nematodos por larva de picudo negro fue la que presentó el mayor promedio de 0.87 larvas de picudo negro muertas que representa un porcentaje de 86.67, seguido de las dosis de 1.500 y 2.500 nematodos con promedios de 0.67 de larvas muertas (tabla 2).

Tabla 2
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad del nematodo a las 72 y 96 horas

Dosis (tratamientos)	72horas	96 horas
0 nematodos	0.00 e*	0.00 e
1000 nematodos	0.87 a	1.00 a
1500 nematodos	0.67 b	0.93 a
2500 nematodos	0.67 c	0.87 a
2000 nematodos	0.47 d	0.87 a

*Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente bajo la prueba de Tukey < 0.05

Patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* a las 96 horas

De acuerdo al análisis de varianza efectuado a las 96 horas hubo diferencia altamente significativa entre las dosis (tratamientos). En la Tabla 2 se presentan medias de los tratamientos de este ensayo donde el mayor promedio es para la dosis de 1000 nematodos con promedio de 1.00 (100%) larvas muertas, seguidos de las dosis 1500, 2000 y 2500 con promedios de 0.93 y 0.87 que representan (93.3 y 87.67%) de larvas muertas. Y el coeficiente de variación de 12.30%.

Discusión

En el presente trabajo donde se investigó la multiplicación y evaluación de la patogenicidad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) a nivel del laboratorio, se estableció lo siguiente:

El nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de *Galleria mellonella*, se multiplicó fácilmente obteniéndose una producción de 271.524 nematodos/larva estos resultados coinciden con los trabajos de Flanders (1996), quien afirma que los rendimientos de *Heterorhabditis bacteriophora* pueden alcanzar de 50.000 a 400.000 nematodo/larva de *Galleria*. De la misma manera Kaya (2003) y Hernández (2006), afirman que este nematodo se multiplica en larvas de *Galleria mellonella* y no necesita de requerimientos especiales.

La sintomatología provocada por el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en los cadáveres de las larvas fue a las 48 horas, donde se manifestó una coloración café rojizo para el *Galleria mellonella* y café pardo para *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda*.

Los cadáveres no presentaron fetidez ni pudriciones húmedas, lo que está relacionado con una de las funciones de la bacteria simbiótica de segregar sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos competidores.

En lo que respecta al tiempo que transcurrió para que los primeros juveniles salieron de los cadáveres de larvas de *Galleria mellonella*, *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda* fue de 5 días, esto se debió posiblemente a la temperatura y humedad relativa.

La dosis que presento mayor porcentaje de mortalidad de larvas de picudo fue la de dos con una concentración de 1.000 nematodo/larva a las 96 horas, de acuerdo a los resultados obtenidos con esta dosis, se concuerda con Sepúlveda, Soto y López (2004).

Conclusiones

La multiplicación de nematodos con larvas de *Galleria mellonella* resultó mayor obteniendo 271.524 nematodos/larva seguido de la larva de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) con una cantidad de 146.857 nematodos/larva y en último lugar la larva de *Spodoptera frugiperda* con una cantidad de 47.044 nematodos/larva.

El tiempo que el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* requirió para causar la muerte de las larvas de *Galleria mellonella*, *Cosmopolites sordidus* y *Spodoptera frugiperda* fue de 48 horas.

La dosis de *Heterorhabditis bacteriophora* que causó mayor mortalidad en las larvas de picudo negro fue de 100% a las 96 horas con una concentración de 1.000 nematodos/larva de picudo negro.

Referencias

Flanders, K. L., Miller, J. M. y Shields, E. J.

- 1996 "In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (*Rhabditida: Heterorhabditidae*), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions". *J. Econ. Entomol.* 89: 373-380.

- Gaugler, R.
1988 "Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes". *Agric. Ecosys. Environ.* 24, 351-360
- Hernández, M., Alcázar, J., Garcés, P. y Gallejo
2006 "Prospección de nematodos entomopatógenos para el control de gusano blanco (*Premnotrypes vorax* Hustache) (Coleóptera: Curculionidae) en Ecuador".
- Kaya, H.
1993 "Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes. Food and Fertilizer Technology Center". Taipei, Republic of China on Taiwan. *Extension Bulletin*. N° 375.
- Reyes, M.
2003 "Patogenicidad de Nematodos entomopatógenos (Nematodo: Steinemematidae, Heterorhabditidae) en larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae)". Tesis de Maestría en Ciencias del Área: Biotecnología.
- Sepúlveda, P., Soto, A. y López, J.
2004 "Evaluación de la virulencia de *Steinernema carpocapsae* All Strain y *Heterorhabditis bacteriophora*, sobre los estados de desarrollo del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*) Germar".