

**MUPLICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
PATOGENICIDAD DEL NEMÁTODO
ENTOMOPATÓGENO *HETERORHABDITIS
BACTERIOPHORA* EN LARVAS DE PICUDO
NEGRO A NIVEL DE LABORATORIO**

*Reina Medina Litardo
Galo Salcedo Rosales
Erika Tapia Rosado
Luis Valdivieso Jara
Armando Canales Canales
Mary Whu Paredes*

**Investigación
Tecnología e Innovación**

Revista de divulgación de la Dirección de Investigaciones y Proyectos Académicos



MULTIPLICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO *HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA* EN LARVAS DE PICUDO NEGRO A NIVEL DE LABORATORIO

Reina Medina^{1,2}, Galo Salcedo^{1,3}, Erika Tapia^{1,4}, Luis Valdivieso⁵, Armando Canales⁵, Mary Whu⁵

RESUMEN

En este trabajo se evalúa la patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), como una opción de control biológico sobre insectos-plagas que afectan a cultivos agrícolas. Al respecto, se implementó la cría de *Galleria mellonella* para la reproducción de este nemátodo y el resultado de la infestación fue del 100% a las 48 horas. De igual manera se estableció la reproducción de larvas de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y del cogollero de maíz (*Spodoptera frugiperda*) como alternativa de multiplicación. En la larva de *Galleria mellonella* se presentó la mayor cantidad de juveniles de nemátodos, obteniendo 271 524,4 individuos en promedio en cada una a temperatura de 27 a 28 °C y con una humedad relativa de 71 %. En relación a la patogenicidad podemos afirmar que a las 96 horas después de infectar las larvas de *Cosmopolites sordidus* con 1000 nemátodos *Heterorhabditis bacteriophora* hubo el 100% de mortalidad.

Palabras claves: patogenicidad, nemátodo, entomopatógeno, infestación, multiplicación.

1 Unidad de Centros de Clase Prácticas Integradas, Instituto Tecnológico Agropecuario de Vines, Universidad de Guayaquil.

2 Correo: recomely@yahoo.com

3 Correo: albersalcedo@yahoo.com

4 Correo: erikita@yahoo.com

5 Investigador Cooperante. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. SENASA, Perú.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de disminuir la excesiva aplicación de insecticidas en las labores de agricultura, debido a sus efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana, motiva la búsqueda de alternativas para combatir el azote de insectos-plagas en cultivos. Una de estas alternativas es el uso de agentes de control biológico.

Existen varias razones que limitan la aceptación del control biológico por parte del agricultor. Entre ellas tenemos el hecho de que los controladores biológicos son de lenta acción; además, los resultados esperados no se producen inmediatamente. Por último, a diferencia de los pesticidas químicos, su aplicación revista mayor complejidad. Actualmente ha crecido el interés por hacer investigación en el control biológico; sin embargo, los resultados que se han obtenido son escasos, aunque las perspectivas son alentadoras.

A través de los procesos de investigación se ha logrado descubrir la acción controladora del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre una serie de plagas, especialmente sobre el *Cosmopolites sordidus*.

Al respecto, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el Centro Internacional de la Papa (CIP) han aislado y identificado 28 poblaciones de nemátodos entomopatógenos (NE). La mayor parte de estos corresponden a aislamientos de cultivo de papa, en rotación con otro cultivo. Once aislamientos muestran alta patogenicidad sobre larvas de *Galleria mellonella*. Los NE Cc 01 y Cc 03 (*Heterorhabditis* sp), muestran una alta patogenicidad sobre larvas de quinto instar de gusano blanco (Hernández *et al.*, 2006).

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

El *H. bacteriophora* introduce una bacteria simbiote en la cavidad del insecto, destruyendo sus tejidos internos y creando un medio favorable para alimentarse y reproducirse. 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 un medio líquido o sólido (Reyes, 2003).

Nemátodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* con sus bacterias asociadas *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente,



representan un sistema único para el control biológico de insectos-plagas. Ensayos en laboratorio y de campo han mostrado que cerca de 17 órdenes y 135 familias de insectos son susceptibles a los nemátodos entomopatógenos en algún grado. Estas especies pueden incorporarse en programas MIP. Bajo las condiciones evaluadas, tanto adultos como larvas de picudo negro son susceptibles al ataque del nemátodo *Heterorhabditis*, respondiendo diferencialmente al aumento de la dosis (Sepúlveda *et al.*, 1996).

Sin embargo, el uso de nemátodos entomopatógenos para el control de plagas es escaso; pero el empleo de esta tecnología debe difundirse, tanto por su efectividad en el control de insectos-plaga, cuanto para que sea conocida, investigada y utilizada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Unidad de los Centros de Clases de Prácticas Integradas del Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces de la Universidad de Guayaquil, localizado en el kilómetro 1.5 de la vía Vinces – Palestina; cuyas coordenadas geográficas son: 01° 34' de latitud sur y 75° 44' de longitud oeste, a una altura de 41m.s.n.m., con una temperatura promedio de 25.4°C, una precipitación pluvial anual de 1 400 mm de lluvia y humedad relativa de 84 % INAMHI (2005).

2.1. Reproducción del nemátodo entomopatógeno

Para la reproducción del nemátodo *H. bacteriophora* se utilizaron 50 larvas del último estadio de *G. mellonella*. Se las dividieron en grupos de 10, colocándolas en caja petri. Se preparó un inóculo de nemátodos con juveniles infectivos (JI) recién emergidos y obtenidos según la técnica de cultivo de nemátodos sobre *G. mellonella*, descrita por Kaya & Stock (1997).

2.2. Establecimiento del protocolo de reproducción del nemátodo entomopatógeno

Para la multiplicación del nemátodo *H. bacteriophora* se dispuso de 50 larvas de *G. mellonella*, 50 larvas de *C. sordidus* y 50 larvas de *S. frugiperda*. Se dividieron en grupos de 10 y se colocaron en una caja petri. Se preparó un inóculo de nemátodos con juveniles infectivos (JI) recién emergidos y obtenidos según la técnica de cultivo de nemátodos sobre *G. mellonella*, descrita por Kaya & Stock (1997). Se añadió 10 ml 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 lavados



con agua destilada. Luego, fueron colocados en la trampa *White* (Figura 1), recomendada por Gaugler, R. (1988).

Una vez obtenidos los nemátodos de la cámara *White*, se procedió a pasarlos 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 nemátodos (cosecha).

En esta agua hay una gran población de nemátodos. Se tomó 1 ml de la misma y se le agregó 100 ml agua destilada pura. Posteriormente, con una jeringa se tomó una muestra de 10 ml, se la colocó en una caja contadora de nemátodo y se realizó el conteo mediante el estéreo microscopio (Figuras 2 y 3).



Figura 1. Trampa *White*. UCCPI. ITAV. UG, 2008



Figura 2. *Heterorhabditis bacteriophora* (J3) UCCPI. ITAV. UG, 2008.



Figura 3. Conteo de nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* UCCPI. ITAV. UG, 2008.

Conservación del nemátodo

Para el almacenamiento de los nemátodos entomopatógenos obtenidos de la trampa *White*, se colocó el contenido de los juveniles infecciosos en un vaso de precipitación, agregando agua destilada. Finalmente, se procedió a almacenar el agua con nemátodo en una funda de polietileno con una esponja envuelta en papel absorbente y en frascos ámbar. Luego se los conservó a una temperatura de 10 a 12° C por 4 meses en refrigeradora o hielera.

2.3. Determinación del grado de patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* en larvas de picudo negro (*C. sordidus*) a nivel de laboratorio

El ensayo se realizó en cajas petri, con papel toalla en el fondo. Se añadió la suspensión de nemátodos en las siguientes concentraciones (0, 1 000, 1 500, 2 000 y 2 500 nemátodos/larva de *C. sordidus*) con 15 repeticiones en cada caso. Se empleó suspensiones de la población, obtenidas en trampa *White* a partir de larvas de *G. 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. Después, se realizaron observaciones a las 24, 48, 72 y 96 horas; se contaron y separaron las larvas muertas. En cada toma de datos se registraron los cambios de coloración en los cadáveres de las larvas de picudo negro.

2.4. Análisis estadístico

Para el establecimiento del protocolo de reproducción del nemátodo entomopatógeno se utilizó el diseño completamente al azar teniendo como tratamientos *G. mellonella*, *S. frugiperda* y *C. sordidus* más el testigo absoluto. Cada uno contó con 5 repeticiones para realizar la multiplicación, teniendo en cuenta una caja petri como unidad experimental. La determinación de la patogenicidad del nemátodo entomopatógeno en larvas de picudo negro, se realizó bajo un diseño de bloques al azar con 5 tratamientos (dosis) y 15 repeticiones, con un total de 75 unidades experimentales. Los datos previos al ANDEVA fueron transformados a arco seno $\sqrt{x + 1}$ y se realizó la comparación de medias de los tratamientos utilizando Tukey 0.05 de probabilidad.

3. RESULTADOS ALCANZADOS

3.1 Reproducción del nemátodo *H. bacteriophora*

El porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella* fue de 20% a las 24

horas y 100% a las 48 horas, con dosis de 5 000 nemátodos, a una temperatura de 27 a 28°C con una humedad relativa de 71%.

3.2. Establecimiento del protocolo de reproducción del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora*

a) Días de mortalidad de larvas *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda*

Fueron dos días con un porcentaje de 100% para *G. mellonella*, 80% para *C. sordidus* y 75% para *S. frugiperda*.

b) Multiplicación del nemátodo *H. bacteriophora* en larvas de *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda*.

En la multiplicación del nemátodo con las larvas de *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda*, las cuales fueron tomados como tratamientos, se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Al realizar la comparación de medias, hubo diferencias estadísticas que indicaron que el tratamiento *G. mellonella* presentó el mayor promedio con 2 715 244.00 nemátodos; seguido del tratamiento *C. sordidus* con un promedio de 1 468 571.20 de nemátodos; y, con menor promedio, el tratamiento *S. frugiperda* con un promedio de 477 044.60 nemátodos.

La emergencia de los nemátodos en las larvas *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda* se presentó a los 5 días después de la infección de las larvas.

La temperatura promedio para multiplicar el nemátodo fue de 27 °C con una humedad relativa de 71 % a nivel del laboratorio.

El tiempo de duración de las larvas de *G. mellonella* para producir nemátodos es de 30 días, 18 días para *C. sordidus*; y, 20 días para *S. frugiperda*.

3.3. Determinación de la patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* en larvas de picudo negro *C. sordidus*

3.3.1. Patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* en larvas de picudo negro *C. sordidus* a las 24 horas.

De acuerdo a la evaluación realizada 24 horas después de instalado el ensayo, no se detectó diferencia estadística entre las dosis (tratamientos) y repeticiones. Del mismo modo, al realizar la comparación de medias Tukey < 0.05 (Tabla I), no se pudo detectar diferencias estadísticas; pero fue evidente que las dosis de 1 500 y 2 000 nemátodos a las 24 horas después de la aplicación obtuvieron mayores cantidades de larvas infectadas con un promedio de 0.27 que representan un porcentaje de 26.67. El coeficiente de variación fue de 22%.

Tabla I
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad del nemátodo
H. bacteriophora a las 24 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*.
 UCCPI. ITAV.UG, 2008.

Tratamientos (dosis)	Media*
1 500	0.27 a
2 000	0.27 a
1 000	0.20 a
2 500	0.20 a
0	1.00 a

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

3.3.2. Patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* a las 48 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*.

De acuerdo a la evaluación realizada a los 48 horas después de instalado el ensayo, se detectó diferencia altamente significativa entre los 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 nemátodo, se obtuvo con la dosis de 1 000 nemátodos, seguido de las dosis de 1 500 nemátodos con un promedio de 0.53 larvas muertas que representa el 53% (Tabla II).

Tabla II
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad del nemátodo
H. bacteriophora a las 48 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*.

Tratamientos	Media*
1 000	0,80 a
1 500	0,53 ab
2 500	0,33 abc
2 000	0,40 bc
0	1,00 c

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

3.3.3. Patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* a las 72 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*.

Al realizar el análisis de varianza a los 72 horas después de instalado el ensayo se detectó diferencias altamente significativas entre las dosis (tratamientos), no así para las 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 al 5%, se evidenciaron diferencias estadísticas entre los promedios; la dosis (tratamientos) de 1 000 nemátodos por larva de picudo negro presentó el mayor promedio (0.87 larvas de picudo negro muertas que representa un porcentaje de 86.67), seguido de las dosis (tratamientos) de 1 500 y 2 500 nemátodos con promedios de 0.67 de larvas muertas (Tabla III).

Tabla III
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad del nemátodo
***H.bacteriophora* a las 72 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*.**
UCCPI. ITAV.UG, 2008

Tratamientos	Media*	
1 000	0,87	a
1 500	0,67	b
2 500	0,67	c
2 000	0,47	d
0	1,00	e

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

3.3.4. Patogenicidad del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* a las 96 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*

De acuerdo al análisis de varianza efectuado a las 96 horas, existe diferencia altamente significativa entre las dosis (tratamientos) y ninguna significación estadística para repeticiones. En la Tabla IV se presentan medias de los tratamientos de este ensayo donde el mayor promedio es para la dosis de 1 000 nemátodos con promedio de 1,00 (100%) larvas muertas, seguidos de las dosis 1 500, 2 000 y 2 500 con promedios de 0.93, 0.87, 0.87 (93.3%, 86.67%, 87.67%) de larvas muertas. Además, se presenta el coeficiente de variación de 12.30% que garantiza que la investigación ha sido bien concluida y de conformidad a los datos que se reportan.



Tabla IV
Comparación de medias de la prueba de patogenicidad del nemátodo
***H. bacteriophora* a las 96 horas en larvas de picudo negro *C. sordidus*. UCCPI.**
ITAV.UG, 2008

Tratamientos	Media*	
1 000	1,00	a
1 500	0,93	a
2 000	0,87	a
2 500	0,87	a
0	1,00	b

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

4. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

El nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* se multiplicó fácilmente en larvas de *Galleria mellonella*, obteniéndose una producción de 271 524,40 nemátodos/larva. Estos resultados coinciden con los trabajos de Flanders (1996), quien afirma que los rendimientos de *H. bacteriophora* pueden alcanzar de 50 000 a 400 000 nemátodo/larva de *Galleria*. Asimismo, Kaya (2003) y Hernández (2006) afirman que este nemátodo se multiplica en larvas de *G. mellonella* y no necesita de requerimientos especiales.

La sintomatología provocada por el nemátodo *H. bacteriophora* en los cadáveres de las larvas fue a las 48 horas, donde se manifestó una coloración café rojiza para el *G. mellonella* y café pardo para *C. sordidus* y *S. 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 *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda* fue de 5 días; esto se debió posiblemente a la temperatura y humedad relativa.

La dosis que presentó mayor porcentaje de mortalidad de larvas de picudo fue la de dos con una concentración de 1 000 nemátodo/larva a las 96 horas. De acuerdo a los resultados obtenidos con esta dosis, se concuerda con Sepúlveda *et al.* (2004) donde se menciona que bajo condiciones evaluadas, tanto adultos como larvas de picudo negro son susceptibles al ataque del nemátodo *Heterorhabditis*, respondiendo diferencialmente al aumento de la dosis.



La especie del género *Heterorhabditis* ha demostrado tener potencialidad para el control de una gran variedad de insectos. Entre sus características tenemos: expedito manejo en laboratorio para su multiplicación masiva; habilidad para buscar sus hospedantes y rapidez para matarlos; eficacia para atacar insectos subterráneos; compatibilidad con una gran cantidad de insecticidas biológicos y químicos y no ocasiona daños al medio ambiente.

5. CONCLUSIONES

Luego del análisis e interpretación de los resultados experimentales se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La multiplicación de nemátodo con larvas de *G. mellonella* resultó mayor obteniendo 271 524,40 nemátodos/larva, seguido de la larva de picudo negro (*C. sordidus*) con una cantidad de 146 857,12 nemátodos/larva. En último lugar, la larva de *S. frugiperda* con una cantidad de 477 044,60 nemátodos/larva.
2. El tiempo que el nemátodo *H. bacteriophora* requirió para causar la muerte de las larvas de *G. mellonella*, *C. sordidus* y *S. frugiperda* fue de 48 horas.
3. La dosis de *H. bacteriophora* que causó mayor mortalidad en las larvas de picudo negro fue de 100 % a las 96 horas con una concentración de 1 000 nemátodos/larva de picudo negro.

6. RECOMENDACIONES

1. Buscar metodologías de aplicación en el campo para el control del picudo negro.
2. Realizar estudios similares en otras localidades dedicadas a la producción de banano para determinar el establecimiento y virulencia de este nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* sobre la población adulta del picudo negro.
3. Determinar el efecto de este nemátodo entomopatógeno sobre otras plagas de otros cultivos.
4. Multiplicar masivamente en forma industrial y artesanal.

7. AGRADECIMIENTOS

A los personeros de la Universidad de Guayaquil, particularmente al Instituto Tecnológico Agropecuario de Vinces por el apoyo incondicional hacia el desarrollo de la Investigación.

Al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) Perú, por el aporte en el proyecto de investigación en las personas de: Ing. M.Sc Luis Valdivieso director del SENASA, Ing. Armando Canales Canales Jefe del Área de Cuarentena y la Ing. Mery Whu Paredes.

8. REFERENCIAS

1. Flanders, K.; Miller, J.; Shields, E. (1996): *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (*Rhabditida: Herorhabditidae*), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *J. Econ. Entomol.* 89: 373-380.
2. Gaugler, R. (1988): Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopatogenic nematodes. *Agric. Ecosys. Environ.* 24, 351-360.
3. Hernández, M.; Alcázar. J; Garcés. P; Gallejo (2006): Prospección de nemátodos entomopatógenos para el control de gusano blanco (*Premnotrypes vorax* Hustache) (Coleoptera: Curcullionidae). Ecuador.
4. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. INAMHI (2005).
5. 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, p. 13.
6. Reyes, M (2003): Patogenicidad de Nemátodos entomopatógenos (Nemátodo: *Steinemematidae*, *Heterorhabditidae*) en larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludems* Loew (Diptera: *Tephritidae*). Tesis de Maestría en Ciencias; Área: Biotecnología.
7. Sepúlveda, P; Soto. A; 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.