

ARTICULOS GENERALES

## Determinación del instar óptimo de *Spodoptera frugiperda* en la reproducción de *Heterorhabditis indica*

### Optimum instar determination of *Spodoptera frugiperda* in the *Heterorhabditis indica* reproduction

Timoteo Alizar Saavedra, Lauren St Louis, Marlén Cárdenas Morales, Roberto Valdés Herrera y Edilberto Pozo Velázquez.

Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara. C.P. 54830.

E-mail: [edilbertopv@uclv.edu.cu](mailto:edilbertopv@uclv.edu.cu)

---

**RESUMEN.** Para determinar el instar óptimo de *Spodoptera frugiperda* para la reproducción de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica* Poinar cepa P<sub>2</sub>M, se emplearon larvas de los instares III, IV y V de este insecto, reconocidos a través del diámetro de su casquete cefálico. Fueron tomadas 12 larvas por instar para cada una de las concentraciones de 250 n/larva y 500 n/larvas. Las evaluaciones se realizaron a partir de las 24 horas después de la inoculación hasta completar las 72 horas. La misma cantidad de larvas sirvió como control con agua estéril. Se determinaron cambios de coloración del exoesqueleto de las larvas desde su coloración original en: pardo, pardo amarillo y pardo oscuro; y la consistencia del cuerpo de las larvas una vez parasitadas y muertas por la acción del nematodo en: F: Flácido; M: Momificado; C.H: Cuerpo Hidratado. Los tratamientos fueron comparados para determinar la mejor concentración de inoculación y el mejor instar para reproducir los nematodos entomopatógenos. El instar más efectivo para la reproducción de los NEPs fue el V de *S. frugiperda* sobre el cual hubo un incremento de 47,194 y 171,7 veces para las dosis de inoculación de 250 n/larva y 500 n/larvas, respectivamente. Las larvas de los instares III al V de *S. frugiperda* se momifican a partir del quinto. día de inoculadas, lo que permite que puedan montarse en puente al sexto día post-inoculación.

**Palabras clave:** Control biológico, nematodos entomopatógenos, reproducción, *Spodoptera frugiperda*.

**ABSTRACT.** A breeding of *S. frugiperda* were took, the nematode employee was *Heterorhabditis indica* Poinar strain P<sub>2</sub>M that this distributed by all Cuba and is reproduces on *Galleria mellonella* L. Larvae of 3rd, 4th and 5th instars of the insect were used for the trial, recognized through the diameter of their cephalic cap. 12 larva for instars were taken for each concentrations of 250 n/larva and 500 n/larva. The evaluations started at 24 hours after the inoculation until 72 hours. The same quantity of larva were used as control with sterile water. Changes of the original larva exoskeleton coloration (brown, brown yellow and brown dark) and the consistency of the body of the larva once parasitised and died by the action of the nematode (F: Flabby; M: Mummified; C.H: Moisturized Body) were determined. The treatments were compared to determine the best inoculation concentration and the best instars to reproduce the entomopathogenic nematode. The 5<sup>th</sup> instars for the reproduction of the NEPs was the more effective of *S. frugiperda*, with an increment of 47.194 and 171.7 times for the doses of inoculation of 250 n/larva and 500 n/larva. Larvae of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instars of *S. frugiperda* mummified starting from the 5<sup>th</sup> day of inoculated, which allows that they can be mounted in White to the sixth day post-inoculation.

**Key words:** Biological control, entomopathogenic nematodes, reproduction, *Spodoptera frugiperda*.

---

## INTRODUCCIÓN

El control biológico es una alternativa viable, y dentro del mismo, el uso de nematodos entomopatógenos es un medio biológico que ha dado buenos resultados para muchos insectos.

Estos nematodos poseen varios de los atributos de un agente de control biológico efectivo (Poinar, 1986): un rango de hospedantes amplio, la habilidad para matar al hospedante en un intervalo de 24-48 horas, la capacidad para crecer sobre medios

artificiales, un estado infectivo estable, capaz de mantenerse almacenado, escasos mecanismos de resistencia en el hospedante y seguros para el ambiente. (Bejarano *et al.*, 2008)

Actualmente, los nematodos entomopatógenos (NEPs) son usados de forma extensiva o inundativa en el control de plagas agrícolas, sin embargo, los reportes de ocurrencia natural, su potencial para el control a largo plazo y los medios de cultivo posibles para estabilizar su población; deben estimular investigaciones para conocer sus potenciales como antagonistas en sistemas sostenibles; así como de los hospedantes alternativos que pueden tener en el campo. (Pozo, 2003; Valdés, 2003)

En Cuba, sólo se reproducen NEPs a través del hospedante *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera; *Pyralidae*) que lleva consigo altos costos de producción (Alemán, 1999 y Rodríguez, 2008). Debido a estos costos, sería preferible buscar alternativas económicas que se inicien con la búsqueda de un hospedante sustituto, en el que pueda reproducirse de forma factible en los centros de reproducción de entomófagos y entomopatógenos.

Uno de los insectos empleados en la reproducción por métodos artesanales de los parasitoides *Euplectrus plathypennae* y *Telenomus* sp. es el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), la cual es susceptible a los nematodos entomopatógenos (Marrero, 2003) y que pudiera ser una alternativa en este sentido, por lo cual se estableció el objetivo siguiente: Determinar la dosis de inoculación y el instar más efectivo para la producción de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis indica*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), ubicado en la Universidad Central de Las Villas (UCLV), entre los meses de septiembre a diciembre de 2009. Se partió de una cría establecida de la especie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith.) (Lepidoptera; *Noctuidae*), provenientes de campos de maíz (*Zea*

*mays* L.) según las metodologías de Gómez *et al.* (1994) y Rojas (2000).

El nematodo entomopatógeno empleado fue la especie *Heterorhabditis indica* Poinar cepa P<sub>2</sub>M, debido a que está distribuido por toda Cuba en CREEs, se ha reproducido en los mismos con eficacia sobre *Galleria mellonella* L. (Fisher le-soux *et al.*, 1998)

Los conteos se realizaron bajo el microscopio-estereoscopio "Olympus", con un aumento de 16x, calculándose la concentración de nematodos de la solución madre original mediante las fórmulas expuestas por Woodring and Kaya (1988):

$$S = N * \frac{1}{M} * (x + 1)$$

Donde:

N= Número de nematodos observados por conteo bajo el microscopio.

M= Número de mililitros en que se llevó a cabo el conteo.

X+1= Factor de dilución.

S= Concentración (nematodos/mL) de la suspensión inicial.

$$A = \frac{D * C}{B}$$

Donde:

A= Mililitros de la suspensión de concentración conocida para ser diluida.

B= Número de nematodos/mL de la suspensión que va a ser diluida.

C= Volumen final que se necesita calcular.

D= mililitros de agua a añadir a la nueva suspensión.

Para conocer cuál es el instar más productivo de *S. frugiperda* en la multiplicación, reproducción, recuperación y cosecha de los infestivos juveniles (ij<sub>3</sub>), de los nematodos entomopatógenos se empleó la cepa P<sub>2</sub>M. Para ello se emplearon larvas de los instares III, IV y V de este insecto, reconocidos a través del diámetro de su casquete cefálico (Dyar, 1890) y para *S. frugiperda*. (Rojas, 2000)

Se seleccionaron 12 larvas por instar para cada una de las concentraciones (tratamientos) empleadas. Se colocaron individualmente en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre un papel de filtro y posteriormente fueron inoculados con las concentraciones de 250 n/larva y 500 n/larvas.

Las evaluaciones se realizaron a partir de las 24 horas después de la inoculación hasta completar las 72 horas. Se tomaron 12 larvas por cada uno de los instares como control, a los cuales se les colocó de igual forma, individualmente en placas de petri y se le añadió a cada una 1 mL de agua destilada estéril, para un total de 108 larvas en el experimento.

Posteriormente se tomaron 2 cadáveres por cada uno de los instares involucrados en el experimento y por cada concentración de inoculación. En el tratamiento control no se apreció ninguna larva muerta. A estos se les realizó una necropsia en solución salina estéril bajo el microscopio estereoscopio, para verificar la existencia en su interior de los nematodos entomopatógenos y la comprobación de la muerte por los mismos, a consecuencia de la acción de los nematodos.

Los cadáveres restantes fueron montados individualmente en trampa "White" o puente (Woodring and Kaya, 1988); de cinco a los seis días después de montado el experimento y se contó la cantidad de infectivos juveniles ( $ij_3$ ) que fueron capaces de salir del cuerpo del insecto, comparando posteriormente cuáles son los instares larvales que pueden ser empleados en la producción de los nematodos entomopatógenos.

Se determinaron además los cambios de coloración del exoesqueleto de las larvas desde su coloración original en: pardo, pardo amarillo y pardo oscuro; y la consistencia del cuerpo de las larvas una vez parasitadas y muertas por la acción del nematodo entomopatógeno en: F: Flácido; M: Momificado; C.H: Cuerpo Hidratado (rompimiento de la pared del cuerpo).

Se anotaron y compararon estos resultados para determinar la mejor concentración de inoculación y el mejor instar para reproducir los nematodos entomopatógenos en *S. frugiperda*.

Todos los resultados obtenidos a través de las investigaciones realizadas en este trabajo fueron analizados y procesados por programas y software soportados sobre Microsoft Windows XP service Pack 3. En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el paquete de programas Stargraphic plus ver. 5.0 para Windows y sus programas ANOVA,

realizando la prueba de Duncan con un nivel de confianza de un 95 % para determinar diferencias significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar cuál es el instar óptimo a utilizar para reproducir los NEPs, se obtuvo como resultado que el V instar de *S. frugiperda* fue el más productivo en ambas dosis de inoculación (250 n/larva y 500 n/larva).

Se aprecia que para las características morfológicas externas de la larva y la consistencia de su anatomía se evidenciaron cambios en la misma por la acción de los nematodos, una vez que estos liberan la bacteria dentro del hemocele del insecto. La muerte de las larvas ocurre desde las 24 horas, y van cambiando su coloración desde un pardo amarillo, hasta un pardo rojizo y pardo oscuro, característica típica que diferencia los géneros *Steinernema* Travassos (1927) y *Heterorhabditis* Poinar (1975). (Nguyen and Hunt, 2007)

A partir de las 48 horas se observó que la larva tomó un color pardo amarillo que posteriormente evolucionó a pardo rojizo a las 120 horas y a pardo oscuro a las 192 horas, momento de la cosecha (Tabla 1).

En cuanto a la consistencia del cuerpo del insecto también se apreciaron cambios significativos. Una vez que las larvas mueren su cuerpo se torna flácido, a lo que le sigue a partir de las 120 horas (cinco días) una momificación en condiciones de humedad relativa ambiental de 70 % aproximadamente y posteriormente a partir de las 192 horas (octavo día) los cadáveres se tornan hidratados, difíciles de manejar por el rompimiento de las paredes del cuerpo por la propia acción de los infestivos juveniles dentro de los mismo para salir al exterior.

Este es el momento óptimo para la cosecha, ya que un día más provocaría el rompimiento de la pared del cuerpo y la salida de los infestivos juveniles con la no recuperación de los mismos y contaminación por niveles de grasa descompuesta de los restos de las larvas.

A partir del quinto día, los cadáveres de las larvas cambiaron de consistencia a momificados, momento óptimo para la salida de los NEPs del hospedante. En este momento se le realizó la necropsia, que resultó positiva en todos los casos y que comprobó la existencia de  $ij_3$ , lo que indicó que se encuentran en una segunda generación y listos para su emergencia del cadáver.

Estos resultados coinciden con Realpe-Aranda et al. (2007), quienes en *Galleria mellonella* evidenciaron el desarrollo de machos y hembras durante la segunda generación, que producen una progenie nueva de infestivos juveniles, lo que es reflejado como el lapso de tiempo para la emergencia de los infestivos juveniles.

**Tabla 1. Evolución, necropsia y recuperación de  $ij_3$  por instar con dosis de 250 y 500 n/larva a los 2, 5 y 8 días**

Instar	Conc. n/larva	Coloración del cuerpo días y (horas)			Consistencia del cuerpo días y (horas)		
		2 (48h)	5 (120h)	8 (192h)	2 (48h)	5 (120h)	8 (192h)
III	250	P. A.	P. A.	P. O.	F	M	M
	500	P. A.	P. O.	P. O.	F	M	M
IV	250	P. A.	P. A.	P. O.	F	F	M
	500	P. R.	P. O.	P. O.	F	M	C. H
V	250	P. A.	P. R.	P. O.	F	M	M
	500	P. R.	P. A.	P. O.	F	M	C. H

P.A: Pardo Amarillento; P.R: Pardo Rojizo; P.O: Pardo Oscuro; (+): Positivo.

F: Flácido; M: Momificado; C.H: Cuerpo Hidratado (rompimiento de la pared del cuerpo)

En cuanto a los rendimientos obtenidos por instares y concentración de nemátodos aplicada se aprecia (tabla 2) que para la concentración de 250 n/larva, las larvas del III y IV instares no pudieron ser cosechadas, no así para la concentración de 500 n/larva. Esto se debió al rompimiento de la pared del cuerpo de las larvas por la acción de los nematodos entomopatógenos, y que al parecer las larvas del III y IV mucho más jóvenes en edad y de menor tamaño no resistieron los ciclos de vida de esta concentración.

Para las larvas del V instar el rendimiento fue de 23 557  $ij_3$  promedio, con una tasa de crecimiento de

98,23, muy por encima de los resultados obtenidos por Molina (2007), que obtuvo para esta concentración una tasa de 53, mientras que con la concentración de 500 n/larva el ciclo de cosecha fue más lento para poder alcanzar en este una cantidad de nematodos que impidió proseguir en más de una generación. (Tabla 2)

Con una dosis de 500 n/mL todos los instares evaluados pueden ser cosechados. Los rendimientos para las larvas del quinto instar, resultaron los más productivos de todos los obtenidos.

**Tabla 2. Nematodos cosechados y cosecha promedio por larva de *S. frugiperda* de los instares III, IV y V y dosis de inoculación (n=12)**

Instar	Conc. (n/larva)	Larvas cosechadas	Nematodos Cosechados (n/mL)	Promedio de (n/larva)	Tasa de crecimiento
III	250	0*	No salieron del cuerpo	-	-
	500	4	35 400	8 850	17,70
IV	250	0*	No salieron del cuerpo	-	-
	500	2	81 900	40 950	81,90
V	250	6	141 400	23 557	98,23
	500	8	682 000	85 850	171,7

\*Larvas con paredes celulares destruidas por la acción de los nematodos.

Estos resultados pueden explicarse debido a que son pocos los nematodos entomopatógenos que penetran (rompen y destruyen la pared) en el cuerpo de las larvas, y pueden tener varios ciclos y aumentar su número poblacional, lo contrario ocurre cuando el número (500 n/larva) es mayor pues se obtiene un solo ciclo y este proceso es más lento, coincidiendo con los estudios clásicos realizados sobre el ciclo de vida de los NEPs dentro del hospedante como Woodring and Kaya (1988); Kaya and Burlando (1989); Kaya *et al.* (1993) y Kaya y Gaugler (1993).

Al colocar las larvas momificadas en el sistema “White” o puente, con la dosis 250 n/larva donde solo en el V instar salieron los nematodos se obtuvo 23 557 nematodos IJ<sub>3</sub> con un incremento de 98,23 veces la dosis inoculada, mientras con la inoculación de 500 n/larvas en el III instar se obtuvieron 8 850 nematodos IJ<sub>3</sub>, para un incremento de 17,7 veces lo inoculado; para el IV instar se obtuvieron 40 950 con un incremento de 81,9 veces y para el V instar 85 850, que fue 171,7 veces la dosis inoculada, por lo cual sin dudas puede considerarse a esta especie como hospedante alternativo en la reproducción masiva de los nematodos entomopatógenos. Para resaltar el papel que posee este insecto, investigaciones realizadas por Castro *et al.* (2009) recomiendan el empleo de *S. frugiperda* como hospedante para la reproducción de biocontroles como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Mientras que Molina (2007) atribuye para la reproducción del género *Rhabditis* spp. el empleo de *S. frugiperda* como hospedante.

Por su parte Realpe-Aranda *et al.* (2007), también mostraron resultados coincidentes empleando *Galleria mellonella*, con una producción acumulada de juveniles infectivos de los nematodos entomopatógenos utilizando la trampa White de 86 250 juveniles infectivos/larva para *S. colombiense* y 78,750 IJ/larva para *H. bacteriophora*; resultado que evidencia la similitud necesaria con *Spodoptera frugiperda* para llevar a cabo dichas producciones.

Estos resultados demuestran la posibilidad de recurrir a un hospedante alternativo en los Centro de Reproducción de Entomopatógenos del Ministerio de Agricultura (MINAGRI), que no poseen crías de *Galleria mellonella* (L.) hospedante de la mosca *Lyxophaga diatraea* (Townsend) que son líneas de producción de los CREES del Ministerio del Azúcar (MINAZ).

En cuanto a los días de cosecha se observó que en la medida que transcurren los días de cosecha se van agotando las emersiones de los IJ<sub>3</sub> desde los cadáveres de *S. frugiperda* (Figura 1), en el sistema de trampa White o Puente y que al tercer día los rendimientos de nematodos (ij<sub>3</sub>) son prácticamente nulos.

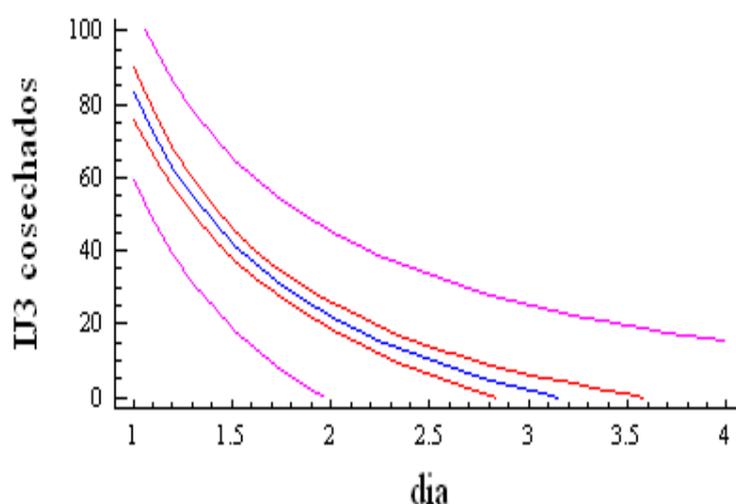


Figura 1. Días de cosecha e infestivos juveniles (ij<sub>3</sub>) cosechados por el sistema “White” o Puente

Estos resultados coinciden con Woodring and Kaya (1988) quienes han aportado que a partir del tercer día comienzan a decomponerse los cuerpos de las larvas *G. mellonella* y en la superficie del agua destilada forman una capa de grasa desprendida de sus cadáveres que atenta contra el intercambio gaseoso, que debe ocurrir para que los nematodos entomopatógenos no mueran, además de la posibilidad de contaminaciones externas de la suspensión obtenida.

## CONCLUSIONES

1. El instar más efectivo para la reproducción de los NEPs fue el V instar larval de *S. frugiperda* sobre el cual hubo un incremento de 47,194 y 171,7 veces para las dosis de inoculación de 250 n/larva y 500 n/larvas, respectivamente.

2. Las larvas de los instares III al V de *S. frugiperda* se momifican a partir del quinto día de inoculadas, lo que permite que puedan montarse en puente al sexto día post-inoculación.

3. La cosecha debe efectuarse desde el sexto hasta el noveno día, donde mayores rendimientos de ij3 se obtienen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alemán, J.: Flujo de producción de *Galleria mellonella* (L) a escala de CREE en Cuba, Tesis de doctorado, Tribunal Nacional de Grado de Sanidad Vegetal, Cuba, 1999.

2. Bejarano G. Fernando et al.: El endosulfán y sus alternativas en América latina, RAP-AL, IPEN, México, Disponible en www.rapam.org publicaciones, 44 pp., 2008.

3. Castro, C.Y.; G. C. Rojas; V. C. Cedeño y V. Velázquez: Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. Tecnología en Marcha, 22(4):28-37, octubre-diciembre de 2009.

4. Fisher-le Saux Marion; H. Mauléon; P. Constant; B. Brunel and N. Boemare: "PCR- Ribotyping of Xenorhabdus and Photorhabdus isolates from the Caribbean Region in relation to the taxonomy and geography distribution of their nematodes hosts". Rev. Applied Environmental Microbiology 64(11):4246-4254, nov. de 1998.

5. Gómez S.J.; J.Rojas; Neida Aragón; A. Pérez y otros: Resumen de la tecnología de Producción y Aplicación de los parasitoides contra *Spodoptera frugiperda*. IX Forum Nacional de Ciencias y Técnica, 1994.

6. Kaya, H. K. and T. M. Burlando: "Development of *Steinernema feltiae* (*Rhabditida: Steinernematidae*) in diseased insect hosts". *J. Invertebr. Pathol.* 53(2): 164-168, 1989.

7. Kaya, H. K.; R. A. Bedding and R. J. Akhurst: "An overview of insect- parasitic and entomopathogenic nematodes, pp. 1-10, en *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*; R. Bedding; R. Akhurst; H. Kaya (Eds.) CSIRO, East Melbourne, Australia, 1993.

8. Kaya, H. and R. Gaugler: "Entomopathogenic nematodes". *Annual Review of Entomology* 38: 181-206, 1993.

9. Marrero, P. María: Nematodos Entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Plutella xylostella* (Linnaeus.) y *Heliothis virescens* (Fabricius), Tesis presentada para aspirar al título de Master en Ciencias en Agricultura Sostenible, CIAP, 54 pp., 2003.

10. Molina Bustamante, C.R.: Patogeneidad de nematodos del género *Rhabditis* y *Heterorhabditis* como posibles agentes de control biológico de larvas de Lepidópteros, Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciatura, Zamorano, Honduras, Diciembre, pp. 1-19, 2007.

11. Nguyen K.B. and D.J. Hunt.: Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts, 816 pp., ISBN: 978 90 04 15293 9 Edit. BRILL, USA, 2007.

12. Pozo, V. E.: Manejo Integrado de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae), en Taller Nacional de Facilitadores en el Control Biológico de Plagas, Santa Clara, Villa Clara, noviembre de 2003.

13. Realpe-Aranda, F. J.; A. E. Bustillo-Pardey y J. C. López-Núñez: "Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café". *Cenicafé* 58(2):142-157, 2007.

14. Rodríguez, Mayra G y Carolina Rosales: Nematodos entomopatógenos: Generalidades. Aspectos de su reproducción y uso como agentes de control biológico en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Curso "Manejo Integrado de Plagas" para especialistas venezolanos del MAT, CENSA, Octubre 16 al 31 de 2007.

15. Rojas, J.: Estudios bioecológicos y control de *Spodoptera frugiperda*, Tesis doctoral, Universidad Central de Las Villas, 97 pp., 2000.

16. Valdés, R.: Umbral económico de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera; Pyralidae) en pepino

(*Cucumis sativus* L.) y lucha biológica con el empleo de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp.) en organopónicos, Trabajo de Diploma no publicado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

17. Woodring, Jennifer L., and H. Kaya.: “Stenernema and Heterorhabditis nematodes: A hand handbook of biology and Techniques”. *Southerncoopers Bull* (331): 1-30, 1988.

Recibido: 21/12/2009

Aceptado: 07/03/2010