

Susceptibilidad de larvas y pupas de *Typophorus nigrinus* F. al nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* Poinar

Susceptibility of larvae and pupae of *T. nigrinus* to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* Poinar

María del Carmen Castellón Valdés¹, Julián González Rodríguez¹ y Edilberto Pozo Velásquez²

¹Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo #6. Santo Domingo, Villa Clara, Cuba

²Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 6½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba

E-mail: mcarmen@inivit.cu

RESUMEN. Con el objetivo de conocer la susceptibilidad de larvas y pupas de *Typophorus nigrinus* Crotch (Coleoptera: Chrysomelidae) al nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, es que se realizó el presente estudio en el que se establecieron diferentes concentraciones de juveniles infectivos por cada 0,25 kg de suelo (JI_{suelo}⁻¹) y un tratamiento control al que se le aplicó agua estéril. Las observaciones se realizaron a partir de las 24 horas de inoculados los nematodos entomopatógenos hasta las 96 horas, y en las mismas se evaluó la mortalidad de las larvas y pupas. Transcurridos diez días, los individuos que presentaron los signos de mortalidad, se transfirieron a trampas *White* para la extracción de los JI de los cadáveres. Este experimento se repitió con el empleo de los JI emergidos y cosechados para comprobar la efectividad de los mismos sobre *T. nigrinus*. Las larvas y pupas de *T. nigrinus* mostraron susceptibilidad al nematodo entomopatógeno *H. indica* en condiciones de laboratorio. El porcentaje de mortalidad para ambos estados de desarrollo aumentó según se incrementó la concentración de JI_{suelo}⁻¹. Diez días después a la inoculación, los nematodos (JI) emergieron del interior de los cadáveres, y se observaron sobre la superficie de los mismos. Con concentraciones superiores a 1 200 JI se logró el 100 % de mortalidad.

Palabras clave: *Typophorus nigrinus*, *Heterorhabditis indica*.

ABSTRACT. In order to know the susceptibility of larvae and pupae of *T. nigrinus* to entomopathogenic nematode *H. indica*, the present study is carried out to establish different concentrations of infective juveniles per each 0.25 kg soil (JI_{soil}⁻¹) and a control treatment to which sterile water was applied. Observations were made 24 hours after inoculating entomopathogenic nematodes and up to 96 hours, and larvae and pupae mortality was assessed. After ten days, individuals with mortality signs were transferred to *White* traps for removal of JI from insect corpses. This experiment was repeated with the use of JI emerged and harvested to check their effectiveness on *T. nigrinus*. Larvae and pupae of *T. nigrinus* showed susceptibility to entomopathogenic nematode *H. indica* in laboratory conditions. The mortality percentage for both development stages increased as the concentration of JI_{soil}⁻¹ increased. Ten days after inoculation, nematodes (JI) emerged from the interior of the bodies, and were observed on their surfaces. At concentrations above 1 200 JI, 100 % mortality was achieved.

Key words: *Typophorus nigrinus*, *Heterorhabditis indica*.

INTRODUCCIÓN

T. nigrinus es una plaga del suelo que se encuentra ampliamente distribuida por todo el territorio nacional y los daños que ocasiona a las raíces tuberosas de boniato al momento de la cosecha, se han incrementado considerablemente en los últimos años. (Castellón y Maza, 2010)

Según Jackson *et al.* (2004) los insectos del boniato son fáciles de controlar con técnicas de manejo

integrado. En este sentido nuestro país ha obtenido resultados alentadores en el manejo de *Cylas formicarius* F. con el empleo de hongos entomopatógenos (Castellón *et al.*, 1996) y aunque se aplican micoinsecticidas para el control de plagas de coleópteros (Pérez, 2004), en la literatura internacional consultada no existen referencias relacionadas con la introducción de la lucha biológica en el manejo de *T. nigrinus*.

Según estudios realizados por Hanula (1993) y Shapiro y Glazer (1996), ha quedado demostrado que las plagas del suelo son susceptibles a los nematodos entomopatógenos aplicados como suspensión acuosa a altas concentraciones o en el interior de larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Entomología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en el municipio de Santo Domingo provincia de Villa Clara. Para la realización del mismo se emplearon larvas de *G. mellonella* infestadas con el nematodo entomopatógeno *H. indica* (cepa P₂M) provenientes del CREE "Luis A. Bergnes" del Ministerio de la Industria azucarera (MINAZ) Villa Clara, con las que se preparó la suspensión primaria 24 horas antes de realizar el estudio. A partir de la suspensión se calcularon las concentraciones iniciales a través de las fórmulas citadas por (Woodring y Kaya, 1988)

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

Donde:

N= Promedio de nematodos por sub muestra al microscopio.

M= Mililitros de la sub muestra.

S= Concentración (nematodos por mililitro) en la solución madre.

X+1= Dilución realizada.

Para preparar las soluciones con las concentraciones deseadas a partir de la suspensión primaria, se empleó la fórmula siguiente citada por los autores anteriores:

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

Donde:

A= Volumen inicial de la suspensión que se desea diluir.

B= Número de nematodos por mL de esta suspensión.

C= Volumen final en mL de la nueva dilución.

D= Concentración deseada en la nueva dilución.

Con los valores obtenidos de C se realizaron las aplicaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las larvas y pupas de *T. nigrinus* mostraron susceptibilidad al nematodo entomopatógeno *H.*

Por lo anteriormente expuesto y con el objetivo de conocer la susceptibilidad de larvas y pupas de *T. nigrinus* al nematodo entomopatógeno *H. indica*, con vistas a incorporarlo dentro de la estrategia ecológica para el control de este insecto, es que realizamos el presente trabajo.

Se establecieron las siguientes concentraciones de juveniles infectivos por cada 0,25 kg de suelo (JI, suelo¹) como tratamientos: 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050, 1200, 1350, 1500 y un tratamiento control con igual cantidad de insectos al que se le aplicó agua estéril. El experimento constó de cinco repeticiones.

Las concentraciones fueron asperjadas a 0,25 kg de suelo Pardo mullido carbonatado (Hernández et al., 2005) previamente esterilizado, que se ubicó en recipientes plásticos de 8,5 cm de diámetro por 7,5 cm de altura, los que contenían una raíz tuberosa de boniato (90 -100 g.). En estos recipientes, a dos centímetros de profundidad, se colocaron cinco larvas de tercer instar y cinco pupas del insecto, con dos días de formadas, procedentes de una cría de laboratorio, para ser infestadas con los JI. Las observaciones se realizaron a partir de las 24 horas de inoculados los nematodos entomopatógenos hasta las 96 horas, y se evaluó la mortalidad de las larvas y pupas.

Transcurridos diez días, los individuos que presentaron los signos de mortalidad, se transfirieron a trampas *White* modificada según lo recomendado por Salas-Luévano (2001), para la extracción de los JI. Este experimento se repitió con los JI emergidos y cosechados para comprobar la efectividad de los mismos sobre *T. nigrinus*.

La comparación de los valores relacionados con el número de insectos muertos se realizó mediante las pruebas de *Kruskal Wallis* y *Mann-Whitney*.

La determinación de la concentración letal media se realizó con el modelo de Probit, propuesto por Raymond (1985)

indica en condiciones de laboratorio. El porcentaje de mortalidad para ambos estados de desarrollo

aumentó según se incrementó la concentración de JI_{suelo}^{-1} . Los insectos comenzaron a morir a partir de las 48 horas en todas las concentraciones utilizadas

con excepción de las menores concentraciones donde las primeras mortalidades de larvas y pupas se produjeron a las 96 horas (Figura 1)

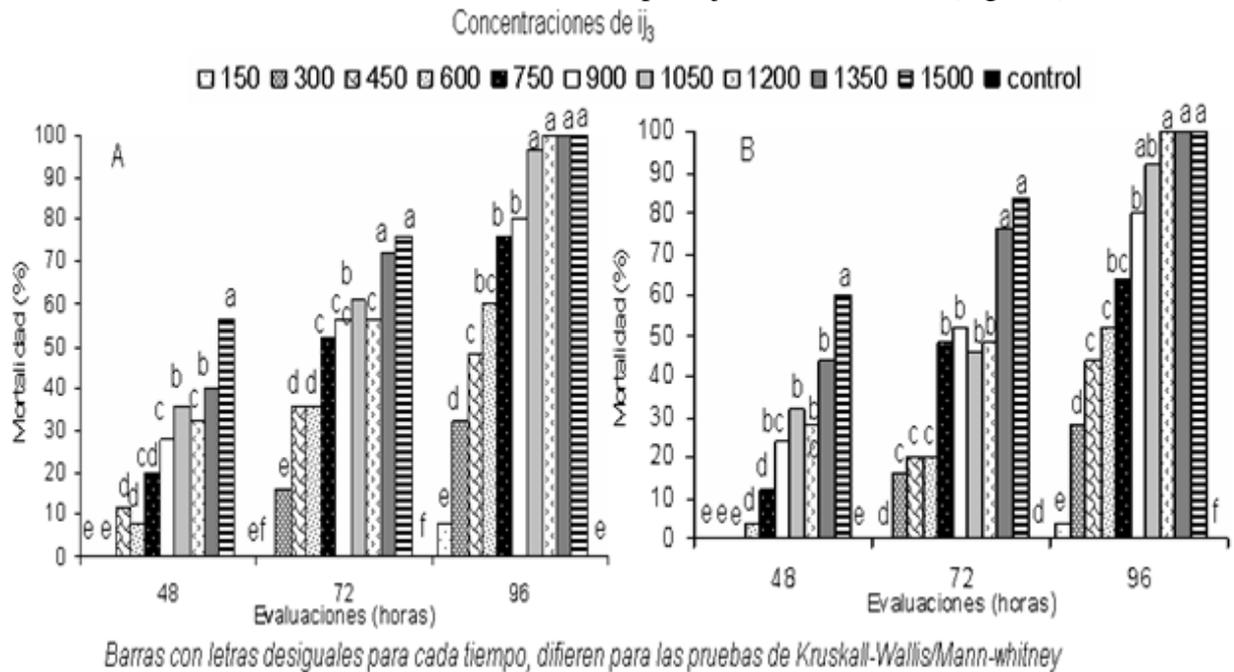


Figura 1. Susceptibilidad de larvas (A) y pupas (B) de *T. nigrilus* a *H. indica* (P_2M) en diferentes concentraciones

A las 96 horas y a partir de los 600 JI_{suelo}^{-1} se apreció que la mortalidad en larvas y pupas fue superior al 50 % sin diferencias significativas entre las concentraciones desde 1 050 hasta 1 500 JI_{suelo}^{-1} . El 100 % de mortalidad para ambos casos se produjo a la concentración de 1 200 JI_{suelo}^{-1} , lo que demostró que *H. indica* cepa P_2M fue efectiva para causar la muerte de *T. nigrilus*.

Las larvas parasitadas tomaron un color pardo rojizo y las pupas una coloración pardo claro (figura 2), evidenciado este cambio de coloración por las especies del género *Heterorhabditis*. (Woodring and Kaya, 1988). Diez días después a la inoculación, los nematodos (JI) emergieron del interior de los cadáveres, y se observaron sobre la superficie de los mismos (Figura 3)



Figura 2. Larva (A) y pupa (B) de *T. nigrilus* con síntomas típicos de infestación por *H. indica*



Figura 3. Masa de JI de *H. indica* cepa P_2M cuando emerge del cuerpo de una pupa de *T. nigrilus*

Smits (1992) al comparar diferentes géneros de nematodos sobre larvas de coleópteros de tercer instar en condiciones de laboratorio, encontró que con *Heterorhabditis* lograba el 98 % de muertes. Resultados similares fueron referidos por Kaya y Stock (1997) y Kaya et al. (2006) al evaluar la susceptibilidad de *Cosmopolites sordidus* Germar a nematodos entomopatógenos. Estos autores obtuvieron altos porcentajes de mortalidad en los dos primeros días después de la inoculación. Además, Evans et al. (2009) evaluaron la susceptibilidad de *Metamasius hemipterus sericeus* a *H. indica* (cepa CIAP-DEY-6) y obtuvieron a los 10 días una mortalidad del 100 %, debido entre otras aspectos a la dureza de la quitina de los coleópteros.

Es necesario destacar que en experimentos anteriores realizados con larvas del primer instar de *T. nigritus*, se encontró que las mismas fueron susceptibles a *H. indica*, aunque el nematodo no logró multiplicarse en el interior de estas. Con relación a este aspecto, diversos autores (Jackson y Brooks 1995; Koppenhöffer et al., 2004; Koppenhöffer y Fuzy 2004) señalaron que son varias las causas que explican las diferencias en el

grado de susceptibilidad entre los estados de desarrollo de disímiles especies, dentro de las que se relacionan características de tipo morfológico, fisiológico y hasta genético que influyen en su control como son: la variación ínter-específica en los mecanismos de defensa, el tamaño y comportamiento del hospedante, el diámetro menor de los espiráculos en larvas jóvenes, las placas sobre estos que impiden la penetración del patógeno, la frecuente defecación en la que se expulsa a los nematodos, respuestas defensivas y evasivas de las larvas (así como las asociadas a la edad) donde estados más desarrollados pueden eliminar patógenos invasores, entre otras. Todos estos aspectos nos muestran algunas de las dificultades que tienen que vencer los nematodos entomopatógenos para poder controlar los diferentes estados de la plaga, lo que coinciden además con lo referido por Forscheler y Gardner (1991) y Melo-Molina et al. (2007) en estudios realizados con larvas de coleópteros del género *Phyllophaga*.

Según el modelo de Probit, la CL_{50} se encontró en el rango entre 415,78 y 538,30 JI por cada 0,25 kg de suelo (Tabla). Las mayores mortalidades ocurrieron en el rango entre 1555,25 y 3265,27 JI.

Tabla . Concentraciones letales obtenidas para *H. indica* a *T. nigritus* según Probit

Concentración Letal	Nivel de Confianza	Rango inferior- Rango superior de CL_{50}
2 = 112,74	95	60,84 - 162,13
50 = 480,93	95	415,78 - 538,30
90 = 1189,01	95	998,17 - 1572,78
95 = 1536,00	95	1231,75 - 2214,43
98 = 2051,60	95	1555,25 - 3265,27

Pchi²=4,83

Hanulla (1993) señaló que al evaluar la susceptibilidad de las larvas de *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae), no siempre la concentración con la que se logró mayor porcentaje de mortalidad en los ensayos de laboratorio, fue la que mostró mejor efectividad en condiciones de campo. En sus estudios los resultados

indicaron que las concentraciones más elevadas de nematodos fueron las más efectivas. Al tener en cuenta los resultados del presente estudio se comprobó que las larvas y pupas de *T. nigritus* fueron susceptibles a diferentes concentraciones de nematodos. En este sentido, con concentraciones superiores a 1 200 JI se logró el 100 % de mortalidad.

CONCLUSIONES

1. Las larvas y pupas de *T. nigritus* mostraron susceptibilidad al nematodo entomopatógeno *H. indica* en condiciones de laboratorio.

2. Con concentraciones superiores a 1 200JI se logró el 100 % de mortalidad de larvas y pupas de *T. nigritus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castellón, María del Carmen y N. Maza: Alcance y significación de las afectaciones causadas por el

“negro brillante” en cultivo del boniato en Cuba. Centro Agrícola, 37(3):43-51, 2010.

2. Castellón, María del Carmen; A. Morales; Lilián Morales; N. Maza; M. Lima; Dania Rodríguez; H. Fuentes: Manejo integrado de *Cylas formicarius* F. (Coleoptera: Curculionidae), en el cultivo del boniato *Ipomoea batatas* (L.) Lam., en Cuba. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. (INIVIT), p. 69-84. En: Lizárraga, A.; María del C. Castellón; Doris Mallqui. 2004. Manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Intercambio de experiencias entre Cuba y Perú. RAAA, Lima, Perú, 1996, 225 p.
3. Evans, G.; R. Valdés-Herrera; Marlén Cárdenas-Morales; Mairín Largo-Mederos; T. Alizar-Saavedra; E. Pozo-Velázquez: Susceptibilidad de *Metamasius hemipterus sericeus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) a una cepa nativa de nematodos entomopatógenos. *Centro Agrícola*, 36(2): 65-69, 2009.
4. Forschler, B.; W. Gardner: Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) to three entomogenous nematodes. *Journal of Economic Entomology* 84(3):841-843, 1991.
5. Hanula, J.: Vertical distribution of black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae) immatures and infection by entomogenous nematodes in soil columns and field soil. *Journal of Economic Entomology* 86 (2):340-347, 1993.
6. Hernández, A.; M. O. Ascanio; D. M. Morales; R. A. Cabrera: Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales y nacionales: Una herramienta útil para la investigación, docencia y producción agropecuaria. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INCA). 2005. En sitio web: <http://www.rutas.ucf.edu.cu>. Consultado el 23 abril de 2008.
7. Jackson, J. J.; M. A. Brooks: Parasitism of Western Corn Rootworm larvae and pupae by *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology* 27(1):15-20, 1995.
8. Kaya, H.; S. P. Stock: Techniques in Insect Nematology. p: 281-324 In: L. Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. Academic Press. Wapato. EE. UU, 1997.
9. Kaya, H. K.; M. M. Aguilera; A. Alumai; H. Y. Choo; M. de La Torre; A. Fodor; S. Ganguly; S. Hazir; T. Lakatos; A. Pye; M. Wilson; S. Yamanaka; H. Yang; R. U. Ehlers: Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38: 134-155, 2006.
10. Koppenhöffer, A. M.; E. M. Fuzy: Effect of *white grub* developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 97 (6): 1842-1849, 2004.
11. Koppenhöffer, A. M.; E. M. Fuzy; R. L Crocker; W. D. Gelernter; S. Polavaparu: Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against 12 *white grubs* species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology* 14 (1):87-92, 2004.
12. Melo-Molina, Elsa; A. Ortega; A. Gailgl: Efecto de nemátodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 33(1): 21-26, 2007.
13. Pérez, N.: Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural (CEDAR). Universidad Agraria de La Habana, Cuba, 2004, 296 p. ISBN: 959-246-083-3.
14. Raymond, M.: Présentation d' un programme d'analyse log probit pour microordenateur. *Cah ORSTOM Ser Entomo Méd Parasitol* 22 (2):117-121, 1985.
15. Salas-Luévano, M. A.: Existencia de nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae) en agrosistemas del cañón de Juchipilazacatecas, FCBA- Universidad de Colima, México. 2001. En sitio Web: <http://www.ciu.reduaz.mx/investigacion/Agropecuarias/WORD/ap09-009.doc>. Consultado el 22 de enero de 2005.
16. Shapiro, D.; I. Glazer: Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology* 25:1455-1461, 1996.
17. Smits, P.: Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis* in grass with *Heterorhabditid* nematodes. p. 229-235 In: T. A. Jackson and T. R. Glare (eds). Use of pathogens in scarab pest management, Intercept. Andover. Inglaterra, 1992, 409 p.

18. Woodring, J. L.; H. K. Kaya: Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR, 1988, 30 p.

Recibido: 11/12 /2013

Aceptado: 05/06/2014