

Artículo original
PATOGENICIDAD, VIRULENCIA Y POTENCIAL REPRODUCTIVO DE *Heterorhabditis bacteriophora* (CEPA HC1) SOBRE *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (SUMMERS)

L.C. Jiménez, E. del Pozo

Departamento Biología-Sanidad Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana. Correo electrónico: lcarlos@isch.edu.cu

RESUMEN: Se evaluó la patogenicidad y la virulencia del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (cepa HC1) sobre *Cylas formicarius* var *elegantulus* Summer en condiciones de laboratorio. Mediante un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones se evaluó la patogenicidad del nematodo tomando en consideración la mortalidad del insecto usando una concentración de 1000 JI.mL⁻¹ y un control. Con igual diseño experimental y número de repeticiones se evaluó la virulencia usando cinco niveles de concentración de JI y un control. Se evaluó además el potencial reproductivo del nematodo sobre el insecto. Se encontró un marcado efecto patogénico del nematodo sobre el insecto, observándose altos porcentajes de mortalidad; la virulencia DL₅₀ y TL₅₀ en gran medida está relacionada con la concentración de JI.mL⁻¹. El potencial reproductivo del nematodo en el insecto puede llegar a valores de 2675 JI.insecto mostrando un valor promedio de 1832 JI.

(Palabras clave: *Heterorhabditis bacteriophora*; *Cylas formicarius* var *elegantulus*; patogenicidad; virulencia)

PATHOGENICITY, VIRULENCE AND REPRODUCTIVE POTENTIAL OF *Heterorhabditis bacteriophora* (STRAIN HC1) ON *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (SUMMERS)

ABSTRACT: The pathogenicity and virulence of the strain HC1 of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Summer) was evaluated on *Cylas formicarius* var *elegantulus* in the laboratory. The nematode pathogenicity, taking into account the insect mortality, was evaluated in a completely randomized design with four repetitions using a concentration of 1000 JI.mL⁻¹ and a control. A similar experimental design with the same number of repetitions was used to evaluate the virulence using five concentrations of JI. The reproductive potential of the nematode on the insect were also evaluated. In this conditions, a significant pathogenic effect of the nematode on the insect was found with high mortality percentages; the virulence DL₅₀ y TL₅₀ was closely related to the concentration of JI.mL⁻¹. The reproductive potential of the nematode on the insect could reach 2675 JI/insect with an average of 1832.

(Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*; *Cylas formicarius* var. *elegantulus*; pathogenicity; virulence)

INTRODUCCIÓN

El boniato *Ipomoea batata* (L.) es uno de los alimentos más importantes en Cuba, con alrededor de 60 000 ha que se plantan cada año. Una de las mayores limitantes en la producción del boniato son las pérdidas causadas por los insectos principalmente por el tetuán del boniato (*Cylas formicarius* var. *elegantulus*). Los daños que produce, han provocado una disminución de las áreas plantadas de boniato en la mayoría de las provincias más afectadas. A pesar de esta disminución y un cambio notable hacia otros cultivos, motivado por el valor del mercado, el boniato sigue siendo un cultivo importante y se considera vital en la dieta humana (1). Este insecto está presente en todas las provincias del país, causando daños en un 45% en ausencia de adecuadas medidas de control (2).

En la actualidad el uso de microorganismos entomopatógenos ofrece grandes posibilidades para resolver problemas de plagas (3). Algunos autores señalan a los nematodos como excelentes reguladores biológicos para estos fines (4,5,6,7,8,9). Los nematodos se ubican dentro de los grupos de microorganismos que ofrecen estas posibilidades y particularmente la especie *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar puede ser utilizada para el control de insectos del Orden Coleoptera, siendo uno de ellos el tetuán del boniato (10).

Heterorhabditis bacteriophora constituye una de las líneas de producción en Cuba para lo cual están diseñadas tecnologías que permiten disponer de determinadas cantidades de nematodos y la cepa que se reproduce es la HC1. Considerando la importancia que tiene el tetuán del boniato y las posibilidades de manejo del mismo con esta especie de nematodo, se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la patogenicidad, virulencia y potencial reproductivo de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *H. bacteriophora* utilizada fue la HC1 aislada por investigadores del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), la cual se reproduce sobre *Galleria mellonella* (L.). Los nematodos se reprodujeron sobre este insecto y se mantuvieron los JI en bandejas con agua corriente por tres días cada vez que se utilizaron. Los especímenes de *C. formicarius* var. *elegantulus* se colectaron en campo sin tratamientos biológicos y se alimentaron en el laboratorio por varios días para descartar posibles agentes biológicos sobre ellos. Durante el tiempo que se mantuvieron los nematodos en la bandeja la temperatura osciló entre 23 y 27°C. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana.

Determinación de la patogenicidad de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

En placas Petri de 50 x 20 mm con papel de filtro estéril en el fondo y la tapa, se añadió 1 mL de una suspensión de nematodos de la cepa HC1 a una concentración de 1000 JI.mL⁻¹. En cada placa Petri se colocaron 10 insectos adultos. Se estableció un control usando la misma cantidad de insectos, a los que se les añadió 1 mL de agua destilada estéril. Se utilizaron cuatro repeticiones, incluyendo el control. Las placas Petri se sellaron y se colocaron en total oscuridad a temperatura ambiente. Se registró el número de individuos muertos cada 12 horas durante 11 días.

El diseño experimental utilizado fue totalmente aleatorizado. Como criterio de mortalidad se consideró la existencia de insectos con adultos hermafroditas a los cinco días de inoculados. Los datos

se transformaron usando la expresión $\arcsin \sqrt{p}$ y se sometieron a un análisis de varianza simple. Las medias se compararon según Tukey al 5%. La temperatura promedio que se registró durante el desarrollo del experimento fue de $23,5 \pm 5^\circ\text{C}$.

Determinación de la virulencia de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

En placas Petri de 50 x 20 mm con papel de filtro estéril en el fondo y la tapa, se añadió 1 mL de una suspensión de nematodos de la cepa HC1 a concentraciones ajustadas a 0; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 JI.mL^{-1} . Cada suspensión de nematodos se preparó con agua destilada estéril incluyendo el control. En cada placa Petri se colocaron 10 insectos y se usaron cuatro repeticiones para cada nivel de inóculo de nematodo. Las placas Petri se sellaron y se colocaron en total oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron evaluaciones cada 12 horas, las cuales se extendieron hasta las 264 horas (11 días consecutivos), contabilizándose el número acumulado de insectos muertos. Como criterio de mortalidad de los insectos a causa del nematodo se consideró la observación en un estereoscopio de adultos hermafroditas en una muestra de 2 insectos por réplica disectados después de cinco días de la inoculación. Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorizado.

Los porcentajes de mortalidad se transformaron usando la fórmula $\arcsin \sqrt{p}$, y se sometieron a un análisis de varianza. Las medias se compararon según Tukey al 5%. Para determinar la DL_{50} y DL_{90} y el TL_{50} , se utilizaron los datos finales de mortalidad y se efectuó un análisis Probit, utilizando un Programa de Análisis de Probita (Universidad de Colima, México). La temperatura promedio registrada durante el desarrollo del experimento fue de $24,3 \pm 5^\circ\text{C}$.

Determinación del potencial reproductivo de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

En placas Petri de 50 x 20 mm con papel de filtro estéril en el fondo y la tapa, se añadió 1 mL de una suspensión de nematodos de la cepa HC1 a una concentración ajustada a 1000 JI.mL^{-1} utilizando agua destilada estéril. Se sometieron a este tratamiento 10 adultos de *C. formicarius* var. *elegantulus* por placa Petri y a los 12 días de inoculados se colocaron de forma individual en trampas White para lo cual se utilizaron placas Petri de 50 mm de diámetro forradas con papel de filtro y se ubicaron dentro de placas Petri de 150 mm de diámetro, añadiéndose suficiente agua hasta hacer contacto con los bordes del papel. Con esto se logró obtener una descarga de juveniles infectivos (J_3) por medio de migración por el papel hacia el agua para lo cual se dejaron transcurrir 48 horas. Estas descargas se contaron de forma individual y posteriormente se calculó el valor promedio. La temperatura promedio registrada durante el desarrollo del experimento fue $23,0 \pm 5^\circ\text{C}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la patogenicidad de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el tratamiento y el control, lo que demuestra el carácter patogénico del nematodo sobre el insecto. Se observa que *H. bacteriophora* fue capaz de provocar un 87,5% de mortalidad en la muestra de insectos a una concentración de 1000 JI.mL^{-1} . La susceptibilidad de *C. formicarius* a nematodos incluyendo a la especie *H. bacteriophora* se ha demostrado en distintos experimentos (4).

En un experimento desarrollado por Moriya y Miyatake (11) sobre larvas y adultos de *C. formicarius* se encontró que *H. bacteriophora*, entre otras especies de nematodos, resultó muy patogénico sobre el insecto. Estos autores consideraron estos resultados de gran valor para seleccionar nematodos para el control biológico de *C. formicarius*. Mannion y Jansson (12) cuando evaluaron la patogenicidad de *H. bacteriophora* sobre *C. formicarius* también encontrando resultados positivos. Sánchez (13) demostró el carácter entomopatogénico de *H. bacteriophora* sobre los estadios de larva, pupa y adultos de *C. formicarius* en laboratorio.

Determinación de la virulencia de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

Las cinco concentraciones probadas mostraron tasas de mortalidad, incluso las más bajas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones estudiadas; sin embargo si existen diferencias significativas con el control (Tabla 1). El nematodo mostró variabilidad en los porcentajes de mortalidad condicionado por la concentración utilizada. Los mayores valores de mortalidad se registraron a las concentraciones más altas, notándose un decremento a medida que la concentración disminuyó.

TABLA 1. Mortalidad de *Cylas. formicarius* var. *elegantulus* por *Heterorhabditis bacteriophora* (cepaHC1) a varias concentraciones./ *Mortality of Cylas formicarius* var. *elegantulus* by *Heterorhabditisbacteriophora* (strain HC1) at different concentrations

Tratamientos	% de mortalidad	
	Media original	Media transformada
5000 JI	100,0	0,0170 a
4000 JI	95,0	0,0171 a
3000 JI	92,5	0,0173 a
2000 JI	90,0	0,0167 a
1000 JI	87,5	0,0167 a
Testigo	7,5	0,0102 b
CV (%)	3,62	

Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$).

Al estar el insecto expuesto a un mayor número de juveniles infectivos aumenta las probabilidades de contraer la infección por el nematodo. En este sentido Moriya y Miyatake (11) en sus trabajos con *C. formicarius* encontraron que los porcentajes de mortalidad que provoca este nematodo sobre el insecto dependen de la concentración de juveniles infectivos aplicados. No obstante, Grewal y Georgis (14) plantean que el insecto puede quedar infectado y morir si un solo nematodo logra penetrarlo. Esto explica por qué aun a bajas dosis se observan valores de mortalidad elevados. También influye en esto las características patogénicas del nematodo en cuestión y la fase de su bacteria simbiote.

Como se observa en la Tabla 2, el 50% de mortalidad en la muestra de insectos se alcanza con una concentración de $115,398 \text{ JI.mL}^{-1}$. En investigaciones con varios aislamientos de nematodos de diferentes especies Moriya y Miyatake (11), encontraron valores de DL_{50} que varían significativamente para cada aislamiento con relación a *C. formicarius*, lo cual se acentuó más al probar el efecto sobre diferentes estadios del ciclo de vida del insecto; detectaron que los estadios de larva y pupa mostraron más susceptibilidad que los adultos y sobre los estadios inmaduros obtuvieron mayores valores de mortalidad con menor concentración de juveniles infectivos. Alegan que estas diferencias pueden deberse a la talla y origen de los nematodos. También se informa que los adultos de *C. formicarius* son

menos susceptibles a *H. bacteriophora* que las fases juveniles del insecto (13).

TABLA 2. Virulencia de *Heterorhabditis bacteriophora* (cepa HC1) sobre adultos de *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (DL50)./ *Virulence of Heterorhabditis bacteriophora* (strain HC1) on adults of *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (DL50)

Dosis	JI. mL-1	Límites de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
DL50	115,398	7,4	1814,4
DL90	1713,500	942,6	3115,0

Mortalidad acumulada a los 11 días de la inoculación.

Los valores de DL₅₀ y DL₉₀ que se muestran en la Tabla 2 referido al efecto del nematodo sobre el insecto son mayores a los encontrados por estos auto-res; sin embargo hay que tener en cuenta que el experimento se realizó con adultos que parece ser una fase del insecto que ofrece resistencia para que pueda ser penetrado.

Las pruebas realizadas con otros curculionidos demuestran una tendencia similar a la observada en esta investigación, así por ejemplo para el caso de *Cosmopolites sordidus* Germar los valores de DL₅₀ se registran en el orden de 14 751 JI, con límites de confianza de 12 290 y 17 918 (15). Estos valores indican que el obtenido en este trabajo suponen que *H. bacteriophora* es 33 veces más efectivo sobre adultos de *C. formicarius* que sobre adultos de *C. sordidus*.

Los resultados obtenidos sugieren que, para aplicaciones en campo, donde las posibilidades de infección son menores debido a barreras ecológicas la dosis de aplicación de los nematodos tendrá que ser elevada.

Como se observa, el 50% de mortalidad en la muestra de insectos se produce en 107,523 horas. La mortalidad del insecto se incrementa a medida que transcurre el tiempo, es decir, existe una relación directa entre el tiempo transcurrido y la mortalidad (Tabla 3).

TABLA 3. Virulencia de *Heterorhabditis bacteriophora* (cepa HC1) sobre adultos de *Cyla. formicarius* var. *elegantulus* (TL50)./ *Virulence of Heterorhabditis bacteriophora* (starin HC1) on adults of *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (TL50)

Nematodo	TL50 horas	Límites de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Cepa HC1	107,523	98,5	117,2

Mortalidad acumulada desde inicio de la infección hasta 11 días.

En todos los casos se comprobó la muerte de los insectos por los nematodos mediante disecciones de los cadáveres a los cinco días de la inoculación, detectándose la presencia de adultos hermafroditas. La habilidad para reproducirse en los cadáveres es muy importante para el establecimiento y persistencia de esta especie de nematodo en condiciones de campo. Esta es una cualidad muy deseada a los efectos del control biológico de esta plaga porque todas sus fases biológicas se desarrollan en el suelo.

Los resultados de este trabajo resultan muy importantes desde el punto de vista práctico. El hecho que esta cepa muestre valores de DL_{50} de 115,398 JI.mL⁻¹ y una TL_{50} de 107,52 horas postinfección, y que esta especie se reproduzca en los cadáveres del insecto es bastante significativo, pues constituye una característica deseable para la aplicación en el campo.

En la Tabla 4 se muestran los resultados del análisis de Probit Dosis-Mortalidad y Tiempo-Mortalidad. En el primer caso (Dosis-Mortalidad) se evidencia que existe una correlación positiva entre la concentración de juveniles infectivos y la mortalidad, según indica el coeficiente de regresión. En el caso del análisis Tiempo-mortalidad, realizado con los datos de la dosis 1000 JI.mL⁻¹ también se evidencia una correlación positiva entre el tiempo y la mortalidad.

TABLA 4. Resultados del Análisis Probit./ Results of Probit Analysis

Indicadores	Resultados
Ecuación: Dosis/Mortalidad.	$Y=0,49+1,11X$
DL_{50} (JI.mL ⁻¹) a las 240 horas.	115,39 JI.mL ⁻¹
Ecuación: Tiempo/Mortalidad.	$Y=12,03+4,22X$
TL_{50} en horas (103 JI.mL ⁻¹)	107,52 horas

Determinación del potencial reproductivo de *H. bacteriophora* (cepa HC1) sobre *C. formicarius* var. *elegantulus*

El rendimiento de nematodos por adultos de *C. formicarius* alcanzó un valor promedio de 1832 JI. Estos resultados no fue posible compararlos con otros, porque en este sentido existen escasos informes de otros autores. Es destacable que en la muestra de insectos que se sometieron a la descarga de los nematodos se pudieron constatar valores máximos de 2675 JI.insecto⁻¹.

Según Grewal y Georgis (14) en insectos grandes como *G. mellonella* los rendimientos pueden oscilar entre 50 000 y 200 000 JI. Poinar (16) informa un promedio de 141 562 con un rango de 50 905-271 593 JI.larva⁻¹. *C. formicarius* es un insecto pequeño, esto pudiera explicar la diferencia numérica en cuanto al rendimiento de nematodos entre una especie de insecto y la otra.

Es criterio de algunos autores, que el potencial reproductivo está determinado por las características de la cepa y por la calidad del hospedante que se utilice. En correspondencia con esto Sánchez (13) plantea que pueden existir diferencias dentro de una misma especie de nematodo lo cual está dado por su comportamiento y fisiología. Esto sugiere que siempre habrá que comprobar constantemente las potencialidades de la cepa como agente de control biológico y tratar de estandarizar en el mayor grado posible el proceso de reproducción.

REFERENCIAS

1. Alcazar JS, Cisneros FV. Manejo Integrado del gorgojo del camote o tetuán del boniato *Cylas formicarius* (Fab.) en Cuba. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima Perú. 2001. 142 p.
2. Anselm R. Efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (cepa HC1) sobre *Cylas formicarius* var. *elegantulus* (Summer). Trabajo de Diploma. UNAH. Facultad de Agronomía, 2002. 43 p.

3. Alatorre RR. Perspectivas en el uso de nematodos en sistemas de Manejo Integrado de Plagas. Hortalizas, frutas y flores. 2000; p. 28- 32.
4. Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. J Invertebr. Pathol. 2005;9(2):150-156.
5. Rodríguez M, Enrique R, González E, Gómez L, Bertolí M, Montano R, et al. Desarrollo y uso racional de nematodos entomopatógenos en el manejo de plagas. En: Actas del VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 22 al 26 de septiembre, Ciudad de La Habana, Cuba. 2008.
6. Rosales C, Puente L, Morales P. Efecto de nematodos entomopatógenos sobre *Spodoptera frugiperda*. En: Actas del VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 22 al 26 de septiembre, Ciudad de La Habana, Cuba. 2008.
7. Koppenhöfer AM, Fuzy EM, Crocker RL, Gelernter WD, Polavarapu S. Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against 12 White Grub Species (Coleoptera: Scarabaeidae). Biocontrol Sci and Technol. 2004;14(1):87-92.
8. Koppenhöfer AM, Fuzy EM. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Invertebr. Pathol. 2006; 92(1):11-22.
9. Abdel-Razek AS, Abd-Elgawad MM. Investigations on the efficacy of entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Biosd.) and *Galleria mellonella* (L.). Arch Phytopathol and Plant Prot. 2007; 40(6):414-422.
10. Montes GJ. Efectividad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa HC 1 en el control de *Cylas formicarius* Fabricius en laboratorio y campo. Tesis en opción al título académico de Master en Sanidad Vegetal. Universidad Agraria de La Habana. 2008. 60 p.
11. Moriya S, Miyatake T. Eradication Programs of Two Sweetpotato Pests, *Cylas formicarius* and *Eusepeus postfasciatus*, in Japan with Special Reference to their Dispersal Ability. JARQ. 2001;35:227-234.
12. Mannion CM, Jansson RK. Comparison of ten entomopathogenic nematodes for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae). J Econ Entomol. 1992;85(5):1642-1650.
13. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 2002.
14. Grewal P, Georgis R. Entomopathogenic nematodes. In: Hall JJ, editor. Methods in biotechnology, Vol 5. Biosecticides. Use and delivery. Chapter 15, Part II. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1999; p. 271-299
15. Figueroa W, Ramón J, Acosta NA. Isolate of entomogenous nematodes *Heterorhabditis* spp. and mortality of larva of *Galleria mellonella*, *Cylas formicarius*, *Eusepeus postfasciatus* and *Cosmopolites sordidus*. J Agric Univ Puerto Rico. 1993; 77(1-2):53-60.
16. Poinar GO. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1990; pp. 23-60.

(Recibido 23-9-2009; Aceptado 30-5-2020)