

Artículo científico

Etología de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* aislados de larvas de gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) plaga de la papa (*Solanum tuberosum*) en Ecuador

Eduardo E. Argotti V.¹, Luis O. Villa T.¹, Claudia P. Hernández S.^{2*},
Patricio Gallegos², Mónica P. Cazar C.³, Jesús Alcazar⁴

¹Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Universidad de la Fuerzas Armadas, ESPE, Sede Santo Domingo Km 23 vía Santo Domingo-Quevedo. Santo Domingo, Ecuador, Email: eeargotti@espe.edu.ec, lovilla@espe.edu.ec.

²Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. Quito-Ecuador, Email: patherz25@yahoo.com.ar, gallegos@fpapa.org.ec.

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador, Email: monicacazar72@gmail.com

⁴Laboratorio de entomología del Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima-Perú, Email: j.alcazar@cgiar

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la caracterización etológica de las poblaciones de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* como candidatos para el control biológico del gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), plaga de importancia económica en los cultivos de la papa (*Solanum tuberosum*). Se evaluó el potencial reproductivo, la capacidad de desplazamiento, la humedad relativa y el rango de hospederos sobre larvas del V instar de *P. vorax*. En el potencial de reproducción determinó que una larva de *P. vorax* con un peso promedio de 62 mg puede producir $66,5 \times 10^3$ IJs del aislamiento CC01 y $6,5 \times 10^3$ IJs del aislamiento CC03. Se estableció que el 45,6% de los IJs se desplazaron hasta 5 cm de profundidad, el 30,6 % hasta 10 cm y el 16,1% hasta 15 cm. La humedad relativa del 15% mostró ser la más óptima para el desplazamiento de los NEPs de los aislamientos CC01 y CC03 con 24,9 IJs/larva de *Galleria mellonella*. El 11% de humedad presentó un promedio de 13,8 IJs/larva y el 5% de humedad mostró 9,3 IJs/larva; lo que demuestra que a mayor porcentaje de humedad del sustrato ingresan un mayor número de IJs por larva, y lo opuesto, cuando el sustrato tiende a ser más seco inhibe la acción y desplazamiento de los NEPs. Los dos aislamientos mostraron ser altamente patogénicos también para otras plagas como *Tecia solanivora* y *Symetrichema tangolias*.

Palabras clave: *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, desplazamiento, *Tecia solanivora*, *Galleria mellonella*, *Symestrichema tangolias*.

ABSTRACT

The objective of this research was the ethological characterization of entomopathogenic nematode populations of the genus *Heterorhabditis* as candidates for the biological control of the white grub (*Premnotrypes vorax*), a pest of economic importance in potato (*Solanum tuberosum*) crops. The reproductive potential, displacement capacity, relative humidity, and host range of *P. vorax* V instar larvae were evaluated. The reproductive potential determined that a *P. vorax* larva with an average weight of 62 mg can produce 66,5x10³ IJs from isolate CC01 and 65x10³ IJs from isolate CC03. It was established that 45.6 % of the IJs moved up to 5 cm depth, 30.6 % up to 10 cm, and 16.1 % up to 15 cm. The relative humidity of 15% showed to be the most optimal for the displacement of NEPs of isolates CC01 and CC03 with 24.9 IJs/larva of *Galleria mellonella*. The 11 % humidity presented an average of 13.8 IJs/larva and 5 % humidity showed 9.3 IJs/larva; which shows that the higher the percentage of humidity of the substrate, the greater the number of IJs per larva, and the opposite, when the substrate tends to be drier, it inhibits the action and displacement of NEPs. The two isolates were shown to be highly pathogenic also for other pests such as *Tecia solanivora* and *Symestrichema tangolias*.

Keywords: *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, displacement, *Tecia solanivora*, *Galleria mellonella*, *Symestrichema tangolias*

ISSN 1390-3004

Recibido: 18-02-2022

Aceptado: 30-11-2022

INTRODUCCIÓN

Los nematodos representan un Phylum muy diverso dentro del reino Animal, los cuales se encuentran colonizando los medios más diversos y variados. Por referencia se les conoce como animales dañinos que afectan al hombre, animales y plantas, pero, existe un grupo de nematodos que parasitan insectos y que, por sus características bioecológicas constituyen un elemento importante en el control biológico de plagas (Poinar, 1990). Los nematodos entomopatógenos (NEPs) pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son patógenos obligados de un amplio rango de insectos plaga, los mismos que son utilizados por más de 20 años para el control de un amplio rango de insectos plaga de importancia agrícola. Los NEPs matan los insectos con la ayuda de bacterias mutualistas (*Xenorhabdus* spp. y *Photorhabdus*) que son transportadas en el intestino del nematodo (Poinar, 1990; Boemare, 2002). Los infectivos juveniles (IJs) del tercer instar penetran a través de las aberturas naturales del hospedero, en algunos casos a través de la cutícula, y liberan las bacterias simbiotas. Las toxinas producidas por las bacterias matan al insecto hospedero dentro de 2 a 3 días (Dowds & Peters, 2002) y los cadáveres proveen de alimentos a tres generaciones de nematodos. Las bacterias de este género se caracterizan por ser Gram-negativas, anaerobias facultativas, no forman esporas, presentan flagelos, y solamente se localizan en el intestino de infectivos juveniles o de hospederos infectados (Garzón et al., 1996;

Stock & Camino, 1992; Agüera & Laumond, 1994; Alcázar y Cañedo, 2003; Kaya & Stock, 1997; Kuno & Hernández, 1982).

Aunque los IJS juegan un papel importante en la muerte del insecto al transportar la bacteria en el intestino, en realidad la bacteria es la responsable de la muerte del insecto, constituyéndose el IJ en el vector que necesita la bacteria para ser transportado hacia el hemocele del insecto hospedero (Gotz *et al.*, 1981). Conocer la etología de las cepas de NEPs de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* es muy importante, debido a que los NEPs son una excelente alternativa para el control biológico de *P. vorax* (gusano blanco de la papa), considerado como una de las plagas más devastadoras de los cultivos de papa en Ecuador. Las larvas al alimentarse hacen galerías en los tubérculos afectando la calidad del producto desde el campo. Para mitigar los daños producidos por las larvas de *P. vorax*, los agricultores emplean insecticidas tóxicos como Carbofuran, Metamidafos, Acefato y Profenofos aplicados al follaje o al suelo (Gallegos *et al.*, 1997).

Por lo expuesto, en este estudio se pretende realizar caracterización etológica de los NEPs de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, como base para el desarrollo, producción y formulación de nuevas herramientas de control biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Potencial de reproducción de los NEPs.- El potencial de reproducción de los aislamientos de NEPs CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* se determinó sobre larvas del V de *P. vorax*. Se midió el peso de 50 larvas de *P. vorax* las mismas que fueron inoculadas con 20 IJs de cada uno de los aislamientos; las larvas fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de arena y 100 μ L de agua estéril. Posteriormente los tubos se colocaron dentro de una bolsa plástica negra y se incubaron a 20°C. La evaluación se realizó después de cuatro días de producida la infección. Las larvas parasitadas se lavaron con agua destilada y se colocaron en forma individual en trampas White. Los IJs obtenidos de la trampa se cosecharon por 25 días. Se realizó el conteo de los IJs por el método de dilución volumétrica (Kaya & Stock, 1997; Alcázar & Cañedo, 2003). Para el análisis estadístico se realizó una regresión entre el número de juveniles infectivos producidos por larva de *P. vorax* y el peso de cada larva.

Capacidad de desplazamiento de los NEPs.- Se siguió la metodología propuesta por Kaya & Stock (1997), utilizando barreras de arena y tierra estériles. Tubos de PVC de 5, 10 y 15 cm de alto se llenaron unos con arena (11 % de humedad) y otros con tierra (10 % de humedad), en el fondo del tubo se colocó una larva de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y en la superficie del tubo se inoculó 50 IJs de cada aislamiento. Los dos extremos de los tubos se cubrieron con placas Petri de 50 mm de diámetro y se incubaron a 20°C. A los 10 días de la inoculación se diseccionaron las larvas de *G. mellonella* para determinar el número de NEPs que ingresaron. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial A x B x C con tres observaciones. Las diferencias significativas entre profundidad y las interacciones entre NEPs, sustrato y profundidad se discriminaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Efecto de la humedad sobre la infectividad de los NEPs.- Se evaluaron tres rangos de humedad relativa en sustrato arena: 5, 11 y 15 %. La humedad fue determinada mediante el uso de un Higrómetro. Se utilizaron tubos de PVC de 5, 10 y 15 cm de alto, en el fondo del tubo se colocó una larva de *G. mellonella*, se llenó el tubo con arena y en la superficie se inoculó 50 IJs de los NEPs. Los extremos del tubo se taparon con cajas Petri de 50 mm de diámetro y se incubaron a 20°C. La evaluación se realizó a los 10 días de la inoculación. Se diseccionaron las larvas para establecer el número de NEPs que ingresaron al hospedero. Se utilizó un DCA con arreglo factorial A x B x C con tres repeticiones. Las diferencias significativas se discriminaron mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Rango de hospederos de los NEPs.- Se probó la susceptibilidad de larvas de *Tecia solanivora* y *Symstrongylosis tangolias* plagas del cultivo de papa con la DL_{50} de 3,2 IJs/larva de *P. vorax* de los aislamientos de NEPs CC01 y CC03. Los insectos evaluados fueron larvas de IV instar de *Tecia solanivora* y larvas de V instar de *Symstrongylosis tangolias*. Las larvas de *T. solanivora* y *S. tangolias* se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de arena estéril humedecida con 100 μ L de agua estéril e inoculadas con la DL_{50} obtenida de los aislamientos CC01 y CC03 sobre larvas de *P. vorax* (Woodring & Kaya, 1988; Garzón et al., 1996). Los tubos Eppendorf se colocaron dentro de una bolsa plástica negra y se incubaron a 20°C. El número de larvas muertas de cada plaga fue registrado hasta 120 horas después de la inoculación. Para verificar la muerte de las larvas por acción de los NEPs, se diseccionaron y se observaron al estereomicroscopio (Koppenhofer & Kaya, 1999). Se efectuó un DCA con tres repeticiones. Las diferencias significativas entre hospederos *T. solanivora* y *S. tangolias* el inóculo se discriminaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Análisis de la información.- Para establecer la relación entre el peso y la producción total de IJs de larvas de *P. vorax*, se aplicó un análisis de regresión lineal cuadrática, mediante el cual se estableció el peso en el cual se obtiene la mayor producción de IJs. La determinación del tiempo óptimo en el cual se presentó la mayor producción de IJs se realizó un análisis de regresión lineal cúbica. Para las pruebas de capacidad de desplazamiento de los IJs, se aplicó un DCA en arreglo factorial A x B x C con tres observaciones. Dos sustratos (arena y suelo) y tres niveles de profundidad (5, 10 y 15 cm), y humedad relativa al 10 % y 11 %. La discriminación de medias entre profundidad y las interacciones se realizó mediante la prueba Tukey ($p \leq 0,05$). En las pruebas de rangos de humedad de los IJs, se aplicó un DCA en arreglo factorial A x B x C con tres observaciones. Las diferencias significativas entre profundidad y las interacciones se discriminaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Para evaluar el rango de hospederos de los IJs, se efectuó un DCA en arreglo factorial A (nematodo) x B (insecto) x C (tiempo) con tres observaciones. Las diferencias significativas entre hospederos y las interacciones se discriminaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial de reproducción de los NEPs.- El aislamiento CC01 producen en promedio $66,5 \times 10^3$ IJs/larva del V instar de *P. vorax* (± 62 mg) (Fig. 1), sin

presentar una correlación significativa ($r = 0,0676$; $p = -0,2301x + 64,016$). En cuanto al aislamiento CC03, se obtuvieron en promedio de $61,5 \times 10^3$ IJs/larva del V instar de *P. vorax* ($\pm 57,05$ mg) (Fig. 2), de igual manera no exhibió una correlación significativa ($r = 0,1816$; $p = -0,306x + 60,263$) (Tabla 1). No se presentó una correlación significativa entre el peso de la larva y el número de juveniles producidos de cada aislamiento de NEPs, ya que el número de IJs que logran penetrar al insecto no son necesariamente todos los inoculados, además de factores externos que pueden influir en el proceso de infección por parte del nematodo y de la bacteria simbiótica, esto incluido la mortalidad natural que se puede presentar.

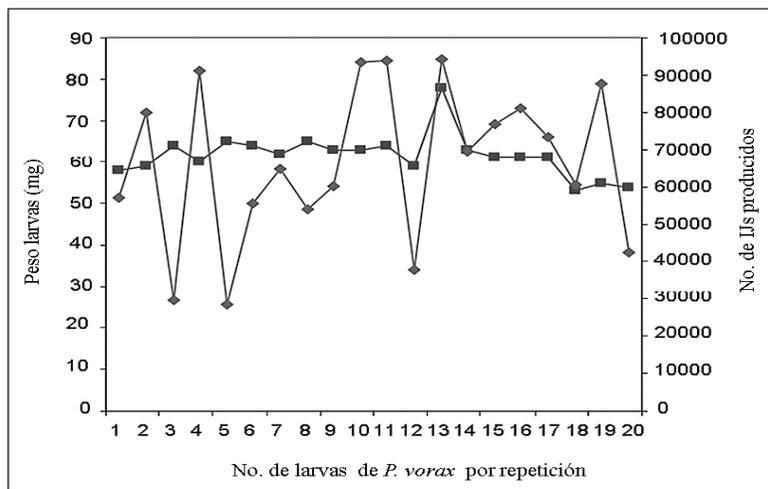


Figura 1. Potencial de producción de NEPs del aislamiento CC01 en larvas del V instar de *P. vorax*

La tasa de $66,5 \times 10^3$ IJs/larva obtenidos del aislamiento CC01 y de $61,5 \times 10^3$ IJs/larva del aislamiento CC03, son valores altos si comparamos a los resultados obtenidos por Cabanillas (2003), quien reporto una producción de $76,8 \times 10^2$ IJs por larva de gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*). Reportes realizados por Wang & Bedding (1996), indican que *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* pueden producir tres generaciones de IJs, con un total de 15×10^4 juveniles por larva de *G. mellonella*, con un peso promedio de 0,15 g en tres semanas. Según Stock & Bonifassi (1994) por cada larva de *G. mellonella* puede obtenerse una progenie de 2×10^5 a $22,5 \times 10^4$ nematodos, resultantes de tres generaciones de *S. feltidae* desarrolladas dentro del insecto hospedante. Según Mannion & Jansson (1992), la habilidad de los NEPs por reproducirse en larvas huéspedes es importante para el establecimiento y persistencia en el campo.

Los resultados mostraron que por cada miligramo de larva de *P. vorax* se obtuvo 1073 IJs para el aislamiento CC01, 1 078 IJs para el aislamiento CC03. Dutky *et al.*, (1964) obtuvieron 1 110 IJs por mg de larva de *G. mellonella*. Wang *et al.*, (1995) reportaron una producción de 3 091 IJs de *S. carpocapsae* por mg de larva de *G. mellonella* inoculados con 0 IJs. Según Unlu *et al.*, (2003) las diferencias en el potencial de reproducción de NEPs, están relacionado con la especie de nematodo, humedad relativa del ambiente y tamaño del hospedero, susceptibilidad del

hospedero, número de bacterias por infectivo juvenil, rango de invasión, temperatura. Posiblemente las diferencias en la virulencia entre especies y aislamientos podrían ser mayores para un hospedero menos susceptible. Woodring & Kaya (1988) reportaron que una larva del último instar de *G. mellonella* produce 35 000 IJs. A propósito, Boff et al., (2000) estableció que la producción de IJs depende de la especie de hospedero, tamaño del hospedero, y dosis del inóculo de NEPs.

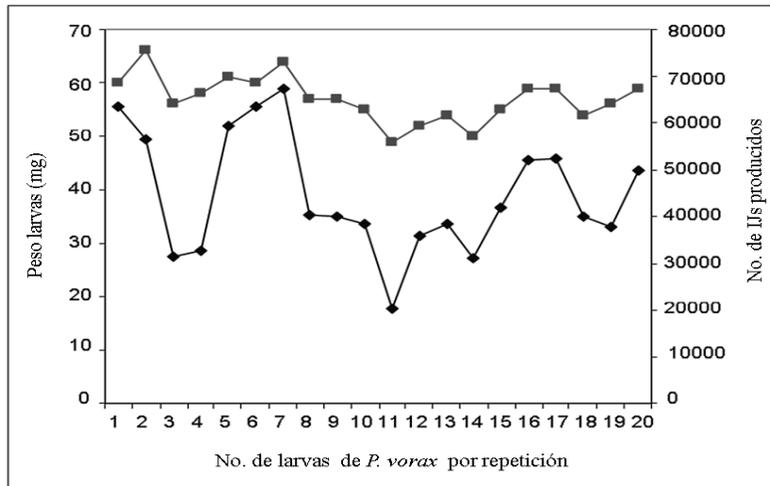


Figura 2. Potencial de producción de NEPs del aislamiento CC03 en larvas del V instar de *P. vorax*

De acuerdo a la curva de producción de IJs de los aislamientos de NEPs CC01 y CC03 en el tiempo (Fig. 3), se encontró que no hay correlación positiva entre el número de IJs emergidos a la trampa White y los días de emergencia ($R^2= 0,7253$; $y= -1\ 272,1x + 13,082$). El primer día de recolección se presentó la mayor emergencia de IJs en ambas poblaciones en la trampa White, 15 640 para CC01 y 34 460 para CC03, estableciéndose una disminución paulatina en la curva hasta el séptimo día de recolección 5 699,8 para CC01 y 2 370,6 para CC03. A partir del noveno día mostró un detrimento en la emergencia de los IJs hasta llegar a cero en el día 23 para el aislamiento CC01 y el día 25 para el aislamiento CC03. El aislamiento CC03 mostró un mayor número de IJs emergidos en la trampa White que CC01.

Aunque la producción de los IJs se evidenció en los nueve primeros días, algunos autores manifiestan que los nematodos del género *Heterorhabditis* pueden continuar produciendo IJs en el tiempo, como en el caso del gorgojo de la patata dulce, que puede producir IJs hasta por 15 días en larvas de *G. mellonella* y 46 días después de la inoculación (Mannion & Jansson, 1992).

Capacidad de desplazamiento de NEPs.- El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos profundidad y sustrato ($F_{2, 168}= 0,0011$; $P= 0,99$), sin embargo, no se identificaron diferencias estadísticas entre aislamientos de NEPs. Las interacciones mostraron diferencias significativas al 5 %,

entre aislamientos de NEPs por profundidades y sustratos por profundidad; el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la interacción aislamiento de NEPs por sustratos; en la triple interacción nematodos-sustratos-profundidades, muestran diferencias significativas, en la tabla 1, se muestra los promedios obtenidos con los diferentes tratamientos.

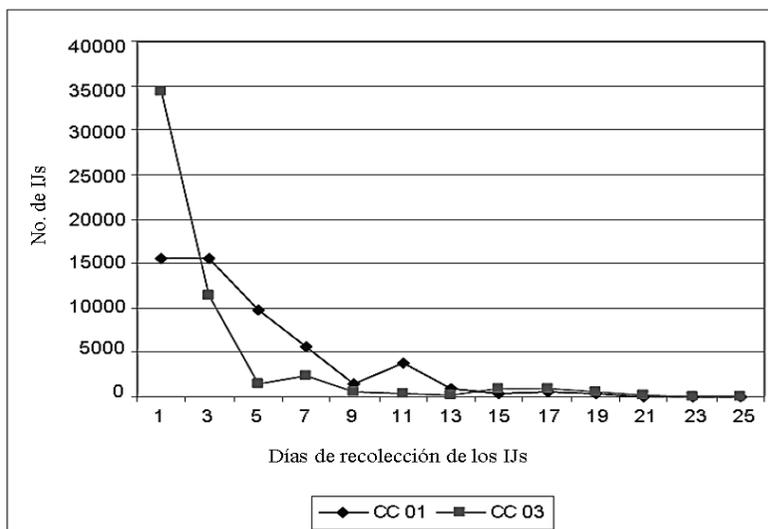


Figura 3. Curva de emergencia de los IJs de los aislamientos CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* sobre larvas del V instar de *P. vorax*.

La discriminación de media Tukey mostró que el mejor tratamiento fue el suelo endémico con un promedio de 16,9 IJs de los aislamientos CC01 y CC03 por larva de *G. mellonella*, mientras que en el sustrato arena el número de IJs que lograron ingresar por larva de *G. mellonella* fueron en promedio de 13,8 IJs/larva.

La prueba de Tukey realizada para el factor profundidad demostró diferencias significativas; la profundidad de 5 cm mostró el mayor número de IJs (22,8) por larva de *G. mellonella*, correspondiendo al 45,6 % de IJs que se desplazaron e infectaron el hospedero. La profundidad de 10 cm mostró un promedio de 15,3 IJs/larva de *G. mellonella*, llegando al 3,6 % de desplazamiento, y a 15 cm de profundidad se evidenció el menor promedio con 8,05 IJs/larva de *G. mellonella*, con un porcentaje de desplazamiento de 16,1 %.

Los resultados mostraron que la capacidad de desplazamiento de CC01 y CC03, decrece a medida que se aumenta la profundidad; posiblemente debido a la disminución del oxígeno (Molyenux & Bedding, 1984) independientemente del tipo de sustrato; a pesar que el número de IJs que colonizaron el hemocele del hospedero fue bajo a profundidades mayores, pero fueron suficientes para provocar la muerte de *G. mellonella*; lo que se puede aseverar que el ambiente fue propicio para que las bacterias simbiotas se reproduzcan en el hemocele del insecto y provoquen la muerte por septicemia. Reportes realizados por Alcázar *et al.* (2005), con una especie de *Heterorhabditis* que parasita larvas de *Bothinus* sp. y

Anomala sp., demostraron que los IJs presentan un desplazamiento de 54 % a 5 cm, 36 % a 10 cm y 12 % a 15 cm de profundidad. De igual forma Georgis & Poinar (1983), en su estudio indican que la mayoría de los IJ permanecieron dentro de 2 cm de la superficie del suelo, sin embargo, algunos penetraron a 10 cm de profundidad en arena y suelos franco-arenosos; mientras que a 24 y 28 cm de profundidad la recuperación de nematodos fue menor. En el análisis de la interacción sustrato por profundidad se evidenció que los mejores tratamientos fueron el suelo y la arena a 5 cm de profundidad con un valor promedio de 23,53 y 22,06 IJs/larva de *G. mellonella*.

Tabla 1. Capacidad de penetración de los aislamientos CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* en larvas de *G. mellonella* en la triple interacción nematodo-sustrato-profundidad.

Aislamientos NEPs	Sustrato	Profundidad (cm)	No. IJs /larva
CC01	Arena 11 %	5	21,4 b
	Arena 11 %	10	14,2 d
	Arena 11 %	15	5,6 d
	Tierra 10 %	5	22,3 ab
	Tierra 10 %	10	17,2 c
	Tierra 10 %	15	9,6 f
CC03	Arena 11 %	5	22,7 ab
	Arena 11 %	10	12,8 de
	Arena 11 %	15	6,0 d
	Tierra 10 %	5	24,7 a
	Tierra 10 %	10	16,9 c
	Tierra 10 %	15	10,9 ef
CV			14,5 %

N = Número de larvas tratadas, CV = Coeficiente de variación.

Según Bedding (1990) los heterorhabdítidos son hermafroditas, solamente con que penetre un IJs al hemocele del hospedero, es suficiente para producir una nueva progenie, característica que los convierte en promisorios como agentes de control biológico. Los heterorhabdítidos son cazadores y tiene la capacidad de dispersión para buscar al hospedero hasta de 90 cm en suelo arenoso y cuando están muy cerca de un hospedero, responden positivamente a señales físicas y químicas producidas por los insectos para encontrarlos (Kaya & Stock, 1997). Solo una pequeña proporción de NEPs de género *Steinernema* son buscadores, la mayoría conservan su energía y esperan al hospedero, o llegan a ser agresivos sólo en las cercanías de éste, lo cual limita sus posibilidades de encontrar al hospedero (Duncan et al., 1996).

Estos resultados brindan importantes indicadores en el momento de realizar un control biológico en campo, ya que proveen información acerca de cómo la población de nematodos podría incrementarse en áreas de alta densidad del hospedero. Según Rosales & Suárez (1998), la infectividad o patogenicidad de los NEPs está condicionada principalmente por la capacidad de sus juveniles

infectivos en detectar la presencia del insecto, movilizarse por el sustrato hasta alcanzarlo y penetrar en su interior.

Efecto de la humedad sobre la infectividad de los NEPs.- El efecto de la humedad se determinó con 5, 11 y 15 % de humedad relativa, a tres profundidades 5, 10 y 15 cm (Fig. 4). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los niveles de humedad y profundidades ($F_{4, 252} = 2,71$; $P = 0,030$); no mostraron diferencias estadísticas entre aislamientos NEPs. Las interacciones presentaron diferencias significativas entre aislamiento de NEPs por profundidades, y humedad por profundidades; en la triple interacción aislamiento de NEPs por humedad por profundidades, se establecieron diferencias significativas al 5 %. En la tabla 1, se muestran los promedios obtenidos en cada tratamiento.

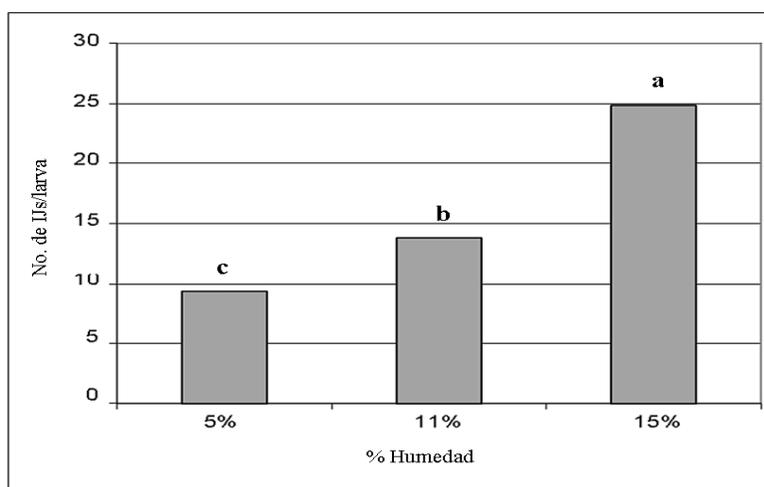


Figura 4. Promedio de IJs de los aislamientos CC01 y CC03 que infectaron larvas de *G. mellonella* a 5, 11 y 15 % de humedad relativa.

El 15 % de humedad resultó ser el más efectivo para el desplazamiento, ya que mostró un promedio de penetración de los dos aislamientos de NEPs de 24,9 IJs/larva de *G. mellonella*. La humedad relativa del 11 % presentó un promedio de 13,8 IJs/larva y el 5 % de humedad relativa mostró 9,3 IJs/larva; lo que demuestra que, a mayor porcentaje de humedad del sustrato de inoculación de los NEPs, ingresan un mayor número de IJs por larva, y al contrario cuando el sustrato tiende a ser seco inhibe la acción y desplazamiento de los NEPs (Fig. 5).

Los resultados obtenidos en esta investigación reafirman a los reportes realizados por Toledo *et al.*, (2004) quienes observaron que niveles de humedad del 6 % presentan bajo parasitismo con *H. bacteriophora* en larvas de *Anastrepha ludens* y un alto parasitismo en niveles de humedad del 12 al 24 %. Kaya (1990) reportó que suelos con humedad del 10 % muestran bajo parasitismo de *S. riobrave* sobre *Anthonomus grandis*; pero mostró un alto parasitismo cuando la humedad relativa fue de 20 %. Sin embargo, la actividad y eficacia de los NEPs son severamente restringidas cuando los niveles de humedad son insuficientes para el movimiento y

persistencia. Hara *et al.* (1991) reportaron que la supervivencia y patogenicidad decrece más rápidamente en suelos húmedos que en suelos secos. Kondo & Ishibashi (1986) encontraron que la actividad e infectividad de IJs de *Steinernema feltidae* son más eficaces en suelos con humedades del 25 al 40 %. Barbercheck & Kaya (1991) demostraron que la migración de los NEPs y la infección del hospedero son inhibidas por un bajo nivel de humedad en el suelo. Molyneux & Bedding (1984; citados por Cabanillas, 2003), reportan que una humedad superior al 40 % puede inhibir la infectividad de los NEPs por inmovilización de los mismos y puede disminuir la sobrevivencia por deficiencia de oxígeno. Cabanillas (2003), reporto un bajo parasitismo en el gorgojo del algodón (*A. grandis*) cuando la humedad del suelo era del 10 %, y un alto parasitismo al 20 % de humedad.

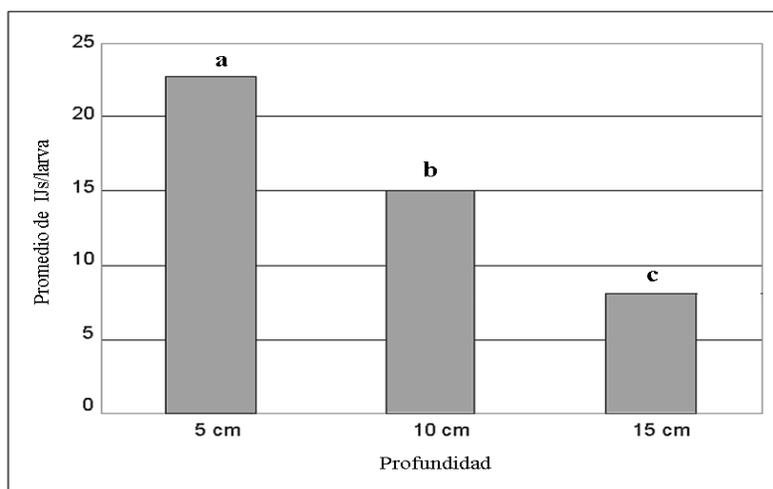


Figura 5. Promedio de IJs de los aislamientos CC01 y CC03 pertenecientes al género *Heterorhabditis* que infectaron larvas de *G. mellonella* a 5, 10 y 15 cm de profundidad.

En cuanto a la profundidad, se estableció que el mejor tratamiento fue el de 5 cm de profundidad con un promedio de 22,7 IJs/larva de *G. mellonella*, constituyendo el 45,2 % de IJs que se desplazaron e infectaron al hospedero. La profundidad de 10 cm presentó un promedio de 16,1 IJs/larva, correspondiendo al 32,2 % de desplazamiento, a 15 cm de profundidad se evidenció el menor promedio de infección con el 9,2 IJs/larva de *G. mellonella*, con un desplazamiento de 18,4 %. La tendencia de desplazamiento de los IJs de las poblaciones CC01 y CC03), se presenta hacia abajo del punto de inoculación, lo que también se evidenció en la prueba de capacidad de penetración.

Los resultados reportados en este estudio confirman las aseveraciones de Alcázar *et al.* (2005), que sostienen que al aumentar la profundidad, el número de juveniles infectivos del nematodo *Heterorhabditis* sp. que logran infectar larvas de *Bothinus* sp. y *Anomala* sp. disminuye.

Rango de Hospederos de los NEPs.- Con la dosis letal media de 3,2 IJs/larva de los aislamientos CC01 y CC03 de *Heterorhabditis* para *P. vorax*, se estimó el rango de

hospederos con larvas de IV instar de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* y larvas de V instar de la polilla de la papa *Symetrichema tangolias*. En el análisis de varianza realizado para la especie *T. solanivora*, no se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos ($F_{1, 4} = 1,4305$, $P > 0,0001$). Se observó una mortalidad promedio de 67,2 % con el aislamiento CC03 y 69,4 % con la población CC01 (promedio de tres repeticiones en el tiempo).

Tabla 2. Efecto de la humedad relativa en la infectividad de los NEPs CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* en larvas de *G. mellonella*.

Aislamiento	Humedad %	Profundidad (cm)	Promedio IJs /larva
CC01	5	5	13,7 gh
	5	10	9,7 i
	5	15	4,8 j
	11	5	21,4 cd
	11	10	14,3 fg
	11	15	5,6 j
	15	5	31,6 a
	15	10	27,4 b
CC03	15	15	17 ef
	5	5	13,8 gh
	5	10	9,3 i
	5	15	4,4 j
	11	5	22,7 c
	11	10	12,8 hi
	11	15	6,0 j
	15	5	32,7 a
CV	15	10	23,1 c
	15	15	17,6 de
			14 %

CV = Coeficiente de variación.

La mayor mortalidad se presentó con el aislamiento CC01 en las tres repeticiones realizadas en el tiempo, sin embargo, la población CC03 mostró un comportamiento similar en el tiempo (Tabla 4). En cuanto a los resultados obtenidos con *S. tangolias*, el análisis de varianza no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos ($F_{1, 4} = 0,6164$, $P > 0,0001$). La mortalidad promedio se estableció en 73,8 % para el aislamiento CC01 y 72,2 % para la población CC03. De igual manera se presentó el mismo comportamiento que con *T. solanivora*, indicando una mayor mortalidad con el aislamiento CC01, aunque el aislamiento CC03 mostró un comportamiento similar en las tres repeticiones realizadas en el tiempo (Tabla 3).

Además, se encontró que las polillas de la papa mostraron una mayor susceptibilidad a la dosis letal media (DL_{50} establecida para gusano blanco de 3,2 IJs/larva), con mortalidades superiores al 60 %, la susceptibilidad fue más evidente en *S. tangolias*. Estos resultados demuestran que los aislamientos CC01 y CC03, son organismos promisorios en el control biológico de diferentes plagas en el cultivo de la papa y otros cultivos de importancia agrícola. En el trabajo de Alcázar *et al.*,

(2005), se reporta en la prueba de rango de hospederos una alta susceptibilidad de *Eusepes postfasciatus*, *P. suturicallus*, *Phthorimaea operculella* y *S. tangolias*, con la dosis letal media de *Heterorhabditis* parásito de larvas de *Bothinus* sp. y *Anomala* sp.

Tabla 3. Rango de hospederos de los aislamientos de NEPs CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* con *T. solanivora* y *S. tangolias*.

Especie Insecto	NEPs	Ensayo	IJs/larva	No. Larvas muertas	Mortalidad %
<i>T. solanivora</i>	CC01	Ensayo 1	3	40	66,6
		Ensayo 2	3	43	71,6
		Ensayo 3	3	42	70,0
	CC03	Ensayo 1	3	39	65,0
		Ensayo 2	3	41	68,3
		Ensayo 3	3	41	68,3
<i>S. tangolias</i>	CC01	Ensayo 1	3	46	76,6
		Ensayo 2	3	44	73,3
		Ensayo 3	3	43	71,6
	CC03	Ensayo 1	3	45	75,0
		Ensayo 2	3	43	71,6
		Ensayo 3	3	42	70,0
CV <i>T. solanivora</i>					3,2 %
CV <i>S. tangolias</i>					3,4 %

CV = Coeficiente de variación.

Aunque algunos autores señalan que los NEPs del género *Steinernema* presentan mayor patogenicidad sobre larvas de lepidópteros que los nematodos del género *Heterorhabditis* (Glazer & Navon, 1990; Cabanillas & Raulston, 1994; citados por Ochoa et al., 1996). De igual forma Koppenhöfer & Kaya (1999), señalan que el NEPs *S. rarum* han mostrado adaptabilidad para infectar larvas de lepidópteros, seguido por larvas de algunos coleópteros, termitas y cucarachas; presentando esta especie de nematodo un comportamiento de búsqueda de alimento intermedio, es decir que puede encontrar a hospederos móviles sobre la superficie del suelo y hospederos sedentarios bajo la superficie del suelo. No siendo esta hipótesis aplicable para todas las especies de lepidópteros, ya que los resultados obtenidos refutarían lo anterior.

CONCLUSIONES

Los porcentajes de producción de IJs de los aislamientos CC01 y CC03 en larvas del V instar de *P. vorax* es una variable transcendental que se debe considerar al momento de seleccionar a los nematodos entomopatógenos como agentes de control biológico de *P. vorax*. Los resultados mostrados nos permiten aseverar que existe una relación entre el peso del hospedero y el número de IJs producidos por larva.

La capacidad de movilizarse de los aislamientos CC01 y CC03 e infectar larvas del V instar de *P. vorax* están relacionados con el tipo de suelo y la humedad relativa; los resultados obtenidos demuestran que suelos francos, franco arenosos y

humedades relativas superiores al 15 % son los más óptimos para el desplazamiento e infección de larvas del V instar de *P. vorax*.

Los IJs de los aislamientos CC01 y CC03 del género *Heterorhabditis* tienen un amplio rango de infección sobre larvas de lepidópteros como *Tecia solanivora* y *Symetrichema tangolias*, presentando porcentajes de mortalidad superiores al 60 %.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro sincero agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación. Al Centro Internacional de la papa (CIP) por su apoyo económico. A todos los funcionarios del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP por su apoyo profesional y logístico durante el trabajo de campo para la recolección de muestras. A Jesús Alcázar, investigador del CIP por darnos las facilidades para participar en la realización de esta investigación, a Oswaldo Villa por la revisión del artículo y por la elaboración del *abstract*.

Conflictos de interés: Los autores declaran no presentar conflictos de interés para este trabajo.

REFERENCIAS

- Agüera M & Laumond C. 1994. Uso de nematodos entomopatógenos en campo. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Alcázar J, Farfán C, Salazar J, Castillo C & Kaya H. 2005. Hallazgo de un nematodo entomopatógeno nativo *Heterorhabditis* parasitando larvas de *Bothinus* sp. y *Anomala* sp. en la Costa Central. *Memorias del XLVII Convención Nacional de Entomología*. Perú 92.
- Barbercheck ME & Kaya, HK. 1991. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environmental Entomology* 20(2): 582-589.
- Barbercheck M & Kaya H. 1991. Competitive interactions between entomopathogenic nematodos and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in soilborne larvae *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environment Entomology* 20(2): 707-712.
- Bedding RA. 1990. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology into developing countries. Pp: 233-246. In: Gauler R, Kaya HK (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press. New Jersey, USA.
- Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy, and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Pp: 35-56. In: Gauler R (ed.). *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Rutgers University. USA.
- Boff MI, Wiegers G, Gerritsen LJ & Smits PH. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2(3): 303-308.

- Cabanillas H. 2003.** Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 188-197.
- Dowds BC & Peters ARNE. 2002.** Virulence mechanisms. *Entomopathogenic nematology*: 79-98.
- Duncan LW & McCoy CW. 1996.** Vertical distribution in soil, persistence, and efficacy against citrus root weevil (Coleoptera, Curculionidae) of two species of entomogenous nematodes. *Environmental Entomology* 25(1): 174-178.
- Dutky SR, Thompson JV & Cantwell GE. 1964.** A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Physiology* 6(4): 417-422.
- Gallegos P, Avalos G & Castillo C. 1997.** El Gusano Blanco de la Papa en Ecuador: Comportamiento y Control. INIAP. Quito, Ecuador.
- Garzón M, Aza B, Jiménez J & Luque J. 1996.** Potencial del nematodo *Steinernema* sp. para el control biológico del gusano blanco de la papa. *Revista Colombiana de Entomología* 22(1): 25 - 30.
- Georgis R & Poinar G. 1983.** Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoalectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology* 15(2): 308-311.
- Glazer I & Navon A. 1990.** Activity and persistence of entomoparasitic nematodes tested against *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 83(5): 1795-1800.
- Gotz P, Boman A & Boman HG. 1981.** Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences* 212(1188): 333-350.
- Hara AH, Gaugler R, Kaya HK & Lebeck LM. 1991.** Natural populations of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) from the Hawaiian Island. *Environmental Entomology* 20(1): 211-216.
- Kaya HK & Gaugler R. 1990.** Soil ecology. Pp. 93-115. In: R. Gaugler & Kaya H. K. (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton.
- Kaya H & Stock P. 1997.** Techniques in insects nematology. 281-324. In: *Manual of techniques in insects pathology*. Academic Press, San Diego. USA.
- Kondo E & Ishibashi N. 1986.** Nictating behavior and infectivity of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., to the larvae of common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. *Applied Entomology and Zoology* 21(4): 553-560.
- Koppenhöfer AM, Choo HY, Kaya HK, Lee DW & Gelernter WD. 1999.** Increased Field and Greenhouse Efficacy against Scarab Grubs with a Combination of an Entomopathogenic Nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control* 14(1): 37-44.
- Koppenhofer A & Kaya H. 1999.** Ecological Characterization of *Steinernema rarum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 120-128.
- Mannion C & Jansson R. 1992.** Comparison of ten entomopathogenic nematodes for control of sweet potato weevil (Coleoptera: Apionidae). En: *Journal of Economic Entomology* 85(5): 1642-1650.

- Molyneux AS & Bedding RA. 1984.** Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematology* 30(3): 358-365.
- Ochoa M, Hamm J, Lezama R, Bojalil L, Arenas M & González M. 1996.** Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia* 3: 25-29.
- Oyarzun P, Espinosa P, Forbes G & Reinoso I. 2002.** El cultivo de la papa en Ecuador. INIAP/CIP. Quito.
- Poinar Jr GO. 1990.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pp: 54-58. In: Gauler R, Kaya HK (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press. New Jersey, USA.
- Rosales L & Suárez Z. 1998.** Nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control del gorgojo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera: Curculionidae). *Entomología Venezuela* 13(2): 123-140.
- Rosales L, Rodríguez MG, Salazar E, Bautista L, Peteira B, Suárez HZ & Centeno F. 2008.** Investigación en nematodos entomopatógenos desarrolladas en el INIA, Venezuela.
- Stock P & Bonifassi E. 1994.** Producción de Nematodos Entomopatógenos. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Stock P & Camino N. 1992.** Nematodos Entomopatógenos. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Stock SP & Camino NB. 1992.** *Hexameris ovistriata* n. sp. (Nematoda: Mermithidae) a parasite of the grasshopper *Staurorhectus longicornis* Gigliotus (Orthoptera: Acridiidae) in Argentina. *Fundamental and applied Nematology* 15(1): 15-18.
- Stock SP, Choo HY & Kaya HK. 1997.** An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematology* 43(1): 15-29.
- Toledo J, Ibarra JE, Liedo P, Gómez A, Rasgado MA & Williams T. 2005.** Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis* under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology* 15: 627-634.
- Unlu IO & Ozer N. 2003.** Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic Nematodes, *Steinernema feltidae*, (Rhabditidae: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rabditidae: Heterorhabditidae). *J. Biol.* 27: 149-155.
- Wang J & Bedding AR. 1995.** Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema capocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental and Applied Nematology* 19(4): 363-367.
- Woodring JL & Kaya HK. 1988.** Steinernematide and heterorhabditide nematodes: a handbook of biology and techniques. Southern cooperative series bulletin. USA.