

Patogenicidad de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar en larvas de *Spodoptera frugiperda* en maíz

Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar in larvae of *Spodoptera frugiperda* in corn

Y. H. Calle¹

Resumen

Objetivos: Determinar la mortalidad de larvas de distintos estadios de *Spodoptera frugiperda* y la eficacia del control, con el uso del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. **Metodología:** Bajo condiciones de laboratorio, se inocularon concentraciones de 10, 100 y 200 nematodos mL⁻¹ sobre los estadios larvales II, III, IV y V de *S. frugiperda* con aspersiones dirigidas. Se evaluó el porcentaje de mortalidad a los 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación; así mismo, se determinó el porcentaje de eficacia de control. **Resultados:** Las larvas de *S. frugiperda* inoculadas con *H. bacteriophora* presentaron mortalidad en sus distintos estadios larvales; los estadios con mayor porcentaje de muerte fueron IV y V. Las concentraciones más efectivas que causaron mayor porcentaje de mortalidad fueron 100 y 200 individuos mL⁻¹. *H. bacteriophora* causó la mortalidad en gran porcentaje de larvas de *S. frugiperda*, logrando provocar la muerte de hasta el 75% de la población evaluada del V estadio. **Conclusiones:** Existe una relación directa entre la concentración del nematodo y el porcentaje de mortalidad en larvas de *S. frugiperda*; la concentración de 200 nematodos mL⁻¹ logró el más alto control de *S. frugiperda*. Los estadios larvales IV y V son los más sensibles a la aplicación del nematodo.

Palabras clave: Entomopatógeno, nematodo, *Heterorhabditis*, *Spodoptera frugiperda*, maíz

Abstract

Objectives: To determine the mortality of larvae of different stages of *Spodoptera frugiperda* and the effectiveness of the control with the use of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. **Methodology:** Under laboratory conditions, at concentrations of 10, 100 and 200 nematodes mL⁻¹ were inoculated on the larval stages II, III, IV and V of *S. frugiperda* by direct sprays. The percentage of mortality was evaluated at 24, 48, 72 and 96 hours after the inoculation; likewise, the percentage of control efficacy was determined. **Results:** The larvae of *S. frugiperda* inoculated with *H. bacteriophora* showed mortality in their different larval stages; the stages with the highest percentage of deaths were IV and V. The most effective doses that caused the highest percentage of mortality were 100 and 200 individuals mL⁻¹. *H. bacteriophora* caused mortality in a large percentage of *S. frugiperda* larvae, up to 75% of the population evaluated in the V larval stage. **Conclusions:** There is a direct relationship between the concentration of nematodes and the percentage of larval mortality of *S. frugiperda*; highest control in the larval population, was at a concentration of 200 nematodes mL⁻¹. The larval stages IV and V are the most sensitive to the application of the nematode.

Keywords: Entomopathogen, nematode, *Heterorhabditis*, *Spodoptera frugiperda*, corn

Introduction

El maíz (*Zea mays* L.) es una de las principales especies cultivadas en el Perú, pues en el año 2017 se sembraron más de 500 mil ha con un rendimiento promedio de 4,23 t ha⁻¹ (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018). Su cultivo es afectado por una serie de plagas, entre las que destaca el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, que se alimenta del cogollo de la planta, afectando el normal desarrollo de las hojas y reduciendo el aparato fotosintético de la

planta, influyendo negativamente en el rendimiento. Para su control se recurre al uso intensivo de agroquímicos, que afectan el medio ambiente, por lo que se hace necesario desarrollar otras estrategias de control que sean más amigables con el medio ambiente.

Entre las diversas alternativas existentes, destaca el uso de los nematodos entomopatógenos (NEP), que es uno de los grupos que recientemente está tomando realce dentro de la gama de

¹Instituto de Educación Superior Tecnológico Público Huando, Lima, Perú.
e-mail: yuricalle@hotmail.com

biocontroladores, al causar mortalidad en ciertas especies de insectos.

Existen dos familias de nematodos que están relacionados con la patogénesis de ciertos insectos: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*. En la segunda familia, la especie *Heterorhabditis bacteriophora*, es un nematodo fácil de multiplicar artificialmente a gran escala utilizando como hospedante natural al insecto *Galleria mellonella* y en medios de cultivo artificiales, líquidos y sólidos (Friedman, 1990; Ehlers & Shapiro, 2005). Estos nematodos entomopatógenos son infectivos cuando se encuentran en los estadios juveniles, al portar en su tracto digestivo a las bacterias patógenas, que son las responsables de la muerte del insecto por septicemia. La bacteria simbiote de *Heterorhabditis* es *Photorhabdus*. Los nemátodos ingresan al cuerpo del insecto, generalmente a través de los orificios naturales y por las partes blandas del integumento, y liberan las bacterias, las que se multiplican y producen toxinas, ocasionando la muerte de los insectos entre las 48 y 72 horas. Los nematodos se alimentan, maduran y se reproducen dentro de estos tejidos degradados por las bacterias.

La efectividad de estos nematodos depende de muchos factores como la temperatura, humedad, especie de hospedante, densidad del nematodo; así, por ejemplo, son altamente sensibles a la desecación a la radiación y la luz ultravioleta, por lo cual se deben tomar en cuenta las horas de aplicación, las temperaturas deben estar dentro del rango de 2-34 °C (Shapiro et al., 2002; Lewis y Clarke, 2012).

Demir et al. (2015) evaluaron la eficacia de nematodos de *Steinernema glaseri*, *S. weiseri* y *Heterorhabditis bacteriophora* solo y en combinación contra larvas de *Curculio elephas* y *Polyphylla fullo* (coleópteros) consideradas plagas de suelo en castaño y otros cultivos, a concentración de 50 y 100 juveniles infectivos/larva; a 25 °C causó mortalidad de 21 a 81 % de larvas. Los resultados obtenidos en estos trabajos demuestran que los nematodos aplicados, solos o en combinación, tuvieron un efecto controlador.

Prasad et al. (2012) determinaron que la dosis letal de 132 juveniles de *Heterorhabditis* indica por larva de *Plutella xylostella*, causó una mortalidad del 73 al 100 % a las 48 horas; mientras que en *Spodoptera litura* alcanzó hasta 33 % de mortalidad. Por su parte Saravanapriya & Subramanian (2007), reportaron una dosis letal de 2,01 a 7,32 juveniles infecciosos de *H. indica*/larva contra la plaga *P. xylostella* y *S. litura*, respectivamente.

La factibilidad del uso de estos biocontroladores,

por su nivel de residualidad como bioinsecticida y seguridad, ha dado lugar a que, en muchos países como Estados Unidos y las naciones de la Unión Europea, no sea necesario su registro (Ehlers & Shapiro, 2005), por lo que es pertinente realizar estudios detallados de su comportamiento, su hospedante y los factores externos que podrían influir en la patogenicidad sobre su hospedante bajo las condiciones de costa peruana. En ese contexto, el objetivo la investigación fue determinar la patogenicidad de *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio.

Metodología

La investigación se desarrolló en el laboratorio de entomopatógenos del Instituto de Educación Superior Tecnológico Huando, Huaral, Lima, durante los meses de junio a setiembre del año 2017. El nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* se adquirió del Programa Nacional de Control Biológico (PNCB) del SENASA-Lima, como cepa en cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* a partir de la cual se multiplicaron en larvas de la misma especie, en el laboratorio del Instituto Huando. Cuatro cadáveres de larvas se colocaron en placas Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 30 mL agua destilada estéril durante 15 minutos, para la emergencia de nematodos desde el interior hacia el agua. Se recogió el agua con nematodos hacia otro frasco conteniendo 200 mL de agua destilada esterilizada, donde se realiza el conteo de la concentración de nematodos mediante una placa marcada de 6 cm diámetro, bajo el microscopio con objetivo 20X.

En un envase de 40 x 25 x 12 cm se colocaron 200 larvas de 4 a 5 cm de *G. mellonella* (últimos estadios), y se aplicó en aspersión 10 mL de una suspensión de agua-nematodo a una concentración de 120 nematodos por mL, incubando luego a una temperatura entre 18-24°C durante cuatro días. Las larvas muertas se lavaron con agua clorada a 200 ppm por 2 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada estéril por dos veces, se secaron con papel toalla esterilizada y fueron trasladados a otro envase de plástico acondicionado de 30 x 20 x 7cm (trampa de White modificada) durante 15 días. La trampa de White modificada consistió en un envase plástico con parrilla de alambre galvanizado de 5 cm de altura, colocada en la base del envase, a la que se agregó 50 mL agua destilada con 100 ppm de ampicilina para evitar proliferación de bacterias.

Se recuperaron larvas de los estadios II, III y IV de *Spodoptera frugiperda* de un campo de producción

comercial de maíz forrajero a los 42 días de la siembra. En laboratorio las larvas se colocaron en bandejas de plástico de 28x22x12cm, y se les alimentó con trozos de hojas y brotes de maíz procedentes del mismo campo; estas bandejas con tapa se mantuvieron durante 96 horas, tiempo que duró la evaluación.

En cada una de las bandejas, según los tratamientos y sobre las larvas de *S. frugiperda* se aplicó 20 mL de suspensión de las distintas concentraciones de nematodos *Heterorhabditis* en agua destilada estéril. Luego las bandejas con las larvas de *Spodoptera* inoculadas se incubaron a temperatura ambiental de 18-22 °C y humedad relativa de 68-90 %.

Se evaluó la mortalidad de las larvas a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la aplicación de los tratamientos, mediante conteo directo y luego se expresó en porcentaje. La eficacia de control se determinó mediante la fórmula de Schneider-Orelli, modificada por Püntener (1981).

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial, siendo los factores en estudio: concentración de nematodos (10, 100, y 200 individuos por mL) y estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (II, III, IV y V). El total de tratamientos fue de 12. Los datos para el análisis de variancia se procesaron con el programa estadístico INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2018). Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significación de 5 %.

Resultados

Mortalidad en larvas de *S. frugiperda*

Según los resultados del análisis de variancia, para el porcentaje de mortalidad y porcentaje de eficacia del control, no se halló interacción entre los estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* y las concentraciones del nematodo, en los diferentes momentos evaluados.

En la Figura 1 se observa que el porcentaje de mortalidad, para los diferentes estadios larvales de *S. frugiperda*, fue similar a las 24 y 48 horas después de la inoculación de los nematodos. A las 72 y 96 horas después de la inoculación, se observaron que los mayores porcentajes de mortalidad se presentaron en las larvas de los estadios IV y V. En general, se aprecia que el mayor porcentaje de mortalidad, para los diferentes estadios larvales, se observa a partir de las 72 horas después de la inoculación. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Demir et al. (2015) y Gokte et al (2019), quienes

refieren que los estadios tempranos fueron menos susceptibles al ataque del nematodo. Según diversos autores (Demir et al. 2015; Salazar et al. 2017), a las 72 horas se producen las toxinas de la bacteria *Photorhabdus luminescens*, microorganismo que ha sido reportado como mutualista con *Heterorhabditis* (Goodrich & Clarked, 2007), y que finalmente provoca la muerte de las larvas.

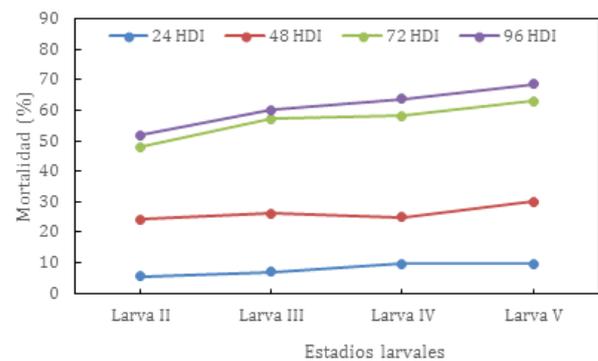


Figura 1. Mortalidad (%) de *S. frugiperda* según estadio larval y horas después de la inoculación (HDI).

Con respecto a la concentración del nematodo, en la Figura 2 se observa que los mayores porcentajes de mortalidad del *S. frugiperda* se obtuvieron con la concentración de 200 nematodos por mL, en los diferentes tiempos evaluados, siguiéndole en importancia la concentración de 100 nematodos por mL. Asimismo, se puede apreciar que existe relación directa entre la concentración de nematodos y el porcentaje de mortalidad, siendo las concentraciones mayores a 100 nematodos por mL, las más infectivas para *S. frugiperda*.

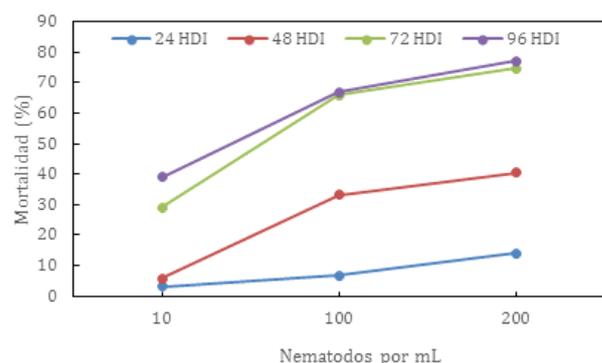


Figura 2. Mortalidad (%) de *S. frugiperda* según concentraciones de *H. bacteriophora* y horas después de la inoculación (HDI).

Eficacia de control en larvas de *S. frugiperda*

En cuanto a eficacia de control, en la Figura 3 se observa que, en los diferentes momentos evaluados, los mayores porcentajes de eficacia se consiguen a

partir del estadio III, incrementándose con la edad de la larva de *S. frugiperda*.

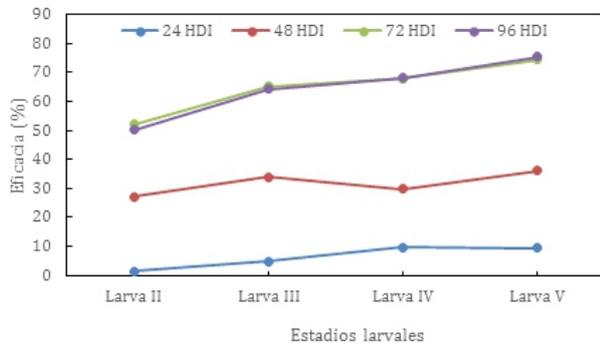


Figura 3. Eficacia de control (%) de *S. frugiperda* según estadio larval y horas después de la inoculación (HDI).

En la Figura 4, se muestra el incremento en la eficacia de control por efecto del factor concentración del nematodo; a las 24 horas después de la inoculación, la eficacia del control fue muy baja. A las 48 horas, la eficacia del control se incrementó linealmente de acuerdo con las concentraciones del nematodo (desde valores menores a 10% a la concentración de 10 nematodos por mL, hasta valores superiores a 60% de control para la concentración de 100 nematodos por mL). La máxima eficacia de control (mayor a 75%) se logró a una concentración de 100 nematodos por mL, a las 72-96 horas después de la incubación.

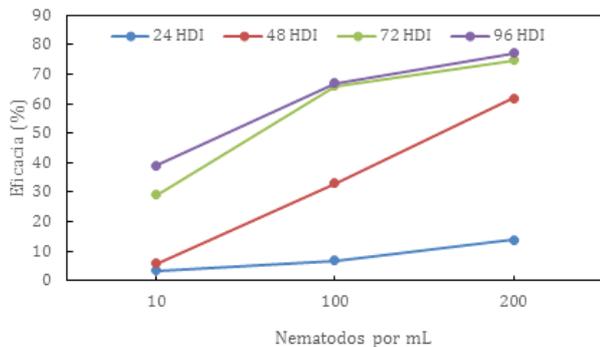


Figura 4. Eficacia de control (%) de *S. frugiperda* según concentraciones de *H. bacteriophora* y horas después de la inoculación (HDI).

Discusión

Los diferentes estadios larvales de *S. frugiperda* presentaron sensibilidad al ataque del nematodo *H. bacteriophora*; las larvas de los estadios III, IV y V presentaron mayor mortalidad en comparación al estadio II; estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Saravanapriya & Subramanian (2007), Demir et al. (2015) y Gokte et al. (2019).

El uso de estos nematodos entomopatógenos para el control de *S. frugiperda*, plaga importante en el cultivo de maíz en la costa del Perú, es una alternativa para el manejo integrado de plagas, ya que el nematodo logra causar la muerte a un gran porcentaje de la población insectil, tal como lo mencionan De Marco et al. (2012), Prasad et al. (2012) y Salazar et al. (2017). *Heterorhabditis* tiene un gran potencial biocontrolador para esta plaga y otros lepidópteros; en el Perú son escasos los trabajos realizados al respecto, por lo que es necesario encontrar la dosis letal media bajo condiciones de campo; también es importante realizar estudios de la soportabilidad del nematodo a los distintos métodos de aplicación (aspersiones foliares, nebulizaciones, inyección al suelo mediante riego tecnificado) determinando los individuos de nematodos que logran parasitar y causar muerte en el hospedante *S. frugiperda*. Al respecto, Suazo (2008) menciona que el porcentaje de mortalidad del nematodo llegó a más de la tercera parte de lo que se había aplicado; aún falta dilucidar estos aspectos para definir la concentración real que se debe aplicar en campo durante el control de plagas.

En cuanto al tiempo de muerte del *S. frugiperda*, autores como French et al. (2007), Lang et al. (2010), Eleftherianos et al. (2011) y Zhu et al. (2011) refieren que la muerte ocurre dentro de los 2 a 3 días después de inoculación, tiempo suficiente para que las bacterias al interior del insecto se multipliquen y liberen las distintas toxinas para causar su muerte.

Por otro lado, Askary et al. (2018) refieren que el nematodo se ve atraído por las heces y cutícula de la larva del insecto para acercarse y encontrar a su objetivo, esta condición también se cumple en el cultivo de maíz, porque el gusano “cogollero” acumula sus heces y el interior de la planta se mantiene húmedo por el vapor de transpiración de las hojas de maíz. Es importante señalar que las larvas muertas pueden comportarse como fuente de inóculo, debido a que muchos de estos cadáveres que contiene al nematodo entomopatógeno, no logran descomponerse; al respecto Goodrich & Clarked (2007) demostraron que la bacteria *Photorhabdus luminiscens* produce ciertos antibióticos que son liberados al interior del cadáver de la larva del insecto, por lo cual éste no logra descomponerse, actuando así en forma mutualista con el nematodo.

Algunos autores consideran que *Heterorahbditis* controla eficientemente muchas larvas de noctuidos y algunos coleópteros (Koppenhofer et al., 2006;

Demir et al., 2015; Salazar et al., 2017; Gokte et al., 2019). Existe información reportada sobre el efecto en otros lepidópteros; sin embargo, sobre la especie *S. frugiperda* aún hay escasez de estudios realizados. Los hallazgos de esta investigación son similares a los reportados por Negrisoli et al. (2010) y Salazar et al. (2017) en *S. frugiperda*, donde el nematodo ocasionó una mortalidad considerable en larvas de esta plaga.

Conclusiones

Heterorhabditis bacteriophora causa mortalidad en gran porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda*, logrando provocar muerte de hasta el 69 % de la población evaluada, bajo condiciones de laboratorio. Se ha comprobado que la concentración de nematodos está en relación directa respecto a la mortalidad de las larvas, siendo la concentración de 200 nematodos por mL, la que ocasionó más de 75% de mortalidad. Respecto a la eficacia de control bajo condiciones de laboratorio, el nematodo logró controlar alrededor del 75 % de la población evaluada a una concentración de 200 nematodos por mL. Los estadios IV y V de la plaga fueron más sensibles a la aplicación del entomopatógeno.

Referencias

- Askary, T. H., Jamal M., Wani A. R., Mohiddin S. & Sofi M. A. (2018). Behavioural Ecology of Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis* for Insect Biocontrol. In E. Lichtfouse (Ed.). *Sustainable Agriculture Reviews 31* (pp. 425-441). Cham, Switzerland: Springer.
- De Marco, J., Schumacher, M., Ligabue, R., Yamazaki, E., Salvadori, J. & Regina, C. (2012). Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control*, 63(3), 253–263.
- Demir, S., Karagoz M., Hazir, S. & Kaya H. (2015). Evaluation of entomopathogenic nematodes and their combined application against *Curculio elephas* and *Polyphylla fullo* larvae. *Journal of Pest Science*, 88(1), 163–170.
- Ehlers, R. U. & Shapiro, D. I. (2005). Mass production. In P. S. Grewal, R. U. Ehlers, D. I. Shapiro. (Eds.). *Nematodes as Biological Control Agents* (pp. 65–79). Wallingford, UK: CABI.
- Eleftherianos, I., Reynolds, S. & Castillo, J. (2011). Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in Parasitology*, 27(12), 537–547.
- French, R. H., Dowling, A. & Waterfield, N. R. (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49(4), 436–451.
- Friedman, M. J. (1990). Commercial production and development. In R. Gaugler, H. K. Kaya. (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 153–172). Boca Raton, US: CRC Press.
- Gokte, N., Bhanare, K. & Nawkarkar, N. (2019). Parasitic potential of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* against two Lepidopteran insect pests of cotton, *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Spodoptera litura*. *Phytoparasitica*, 47, 31-41.
- Goodrich, H. & Clarked, D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*, 64(2), 260-268.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. (2018). *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Koppenhofer, A. M., Grewal P. S. & Fuzy, E. M. (2006). Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control*, 38(3), 397–404.
- Lang, A. E., Schmidt, G., Schlosser, A., Hey, T. D., Larrinua, I. M., Sheets, J. J., Mannherz, H. G. & Aktories, K. (2010). *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science*, 327(5969), 1139-1142.
- Lewis, E. E. & Clarke, D. J. (2012). Nematode parasites and entomopathogens. In F. E. Vega & H. K. Kaya. (Eds.). *Insect Pathology* (pp. 395–424). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Ministerio de Agricultura y Riego (2018). *Boletín estadístico de producción agrícola y ganadera*. Sistema integrado de estadística agraria. Lima, Perú.

- Negrisoli, A. S., Garcia, M. S., Negrisoli, C., Bernardi, D. & Silva, A. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops. *Crop Protection*, 29(7), 677–683.
- Prasad, C. S., Abid, H. M., Pal, R. & Prasad, M. (2012). Virulence of nematode *Heterorhabditis indica* (Meerut strain) against lepidopteran and coleopteran pests. *Vegetos* 25(1), 343–351.
- Püntener, W. (1981). *Manual for field trials in plant protection second edition*. Basel, Switzerland: Ciba-Geigy Limited.
- Salazar, J. D., Castelblanco, A., Rodríguez, M. X., Teran, W. & Sáenz, A. (2017). *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708 pathogenicity in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pacific Entomology*, 20(4), 1112–1121.
- Saravanapriya, B. & Subramanian, S. (2007). Pathogenicity of EPN to certain foliar insect pests. *Annals of Plant Protection Sciences* 15(1), 219–222.
- Shapiro, D. I., Cottrell, T. E., Mizell, R. F., Horton, D. L. & Davis, J. (2009). A novel approach to biological control with entomopathogenic nematodes: prophylactic control of the peachtree borer, *Synanthedon exitiosa*. *Biological Control*, 48(3), 259–263.
- Shapiro, D. I., Gouge, D. H. & Koppenhöfer, A. M. (2002). Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In R. Gaugler. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 333–355). Wallingford, UK: CABI.
- Suazo, O. (2008). *Optimización de los parámetros de aplicación de Heterorhabditis bacteriophora para el control de Spodoptera frugiperda en cultivo de maíz en condiciones de campo, Zamorano, Honduras* (tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Zhu, H., Grewal, P. S. & Reding, M. E. (2011). Development of a desiccated cadaver delivery system to apply entomopathogenic nematodes for control of soil pests. *Applied Engineering for Agriculture*, 27(3), 317–324.