

PATOGENICIDAD DEL NEMATODO *Neoaplectana carpocapsae* EN LARVAS, PREPUPAS Y PUPAS DE *Oxydia trychiata* 1

Alex E. Bustillo 2

INTRODUCCION

Dentro de los agentes de control biológico de plagas, los nemátodos parásitos de insectos constituyen un grupo relativamente nuevo, sobre el cual no existe mucha información con relación a su uso en niveles comerciales. Es indispensable conocer las posibilidades que ofrece en nuestro medio forestal colombiano el nemátodo *Neoaplectana carpocapsae* Weiser en el control del *Oxydia trychiata* (Guenée) (Lepidoptera: Geometridae). En este trabajo se presentan los resultados sobre la patogenicidad del nemátodo en los diversos estados inmaduros del medidor gigante y la técnica desarrollada para multiplicarlo masivamente en el laboratorio.

REVISION DE LITERATURA

Los insectos y los nemátodos han desarrollado muchas relaciones entre si. La más importante desde el punto de vista de control de insectos está constituida en aquella en que el nemátodo después de matar al insecto, libera una bacteria esencial para su nutrición. Esta condición tan especializada ha sido desarrollada por la familia Neoaplectanidae, la cual ha llegado a relacionarse simbióticamente con bacterias específicas.

El nemátodo denominado DD-136 es conocido desde 1954 cuando el Dr. Walter Hough lo encontró en Virginia en larvas de *Cydia (Carpocapsa) pomonella* (L.) y fue considerado por Steiner como una nueva especie de *Neoaplectana* (Dutky y Hough, 1955). Más tarde Dutky (1959) registró la asociación de este nemátodo con una bacteria, pero fueron Poinar y Thomas (1965) los que aislaron la bacteria de la cavidad intestinal del nemátodo y la nombraron *Achromobacter nematophilus* Poinar y Thomas.

La asociación entre la bacteria y el nemátodo es del tipo mutualístico. La bacteria es protegida por las formas juveniles infectivas del *Neoaplectana* y una vez que éstas penetran en una larva hospedante liberan la bacteria. A su turno, la bacteria al causar septicemia en el insecto provee el ambiente necesario para la reproducción del nemátodo dentro del huésped (Poinar y Thomas, 1966).

El nemátodo *N. carpocapsae* fue descrito por Weiser de larvas de *C. pomonella* colectadas en Checoslovaquia en 1955. Pero fue solo 12 años más tarde cuando Poinar (1967) demostró que el DD-136 era en efecto una raza de *N. carpocapsae*.

La familia Neoaplectanidae incluye el género *Neoaplectana*, el cual contiene alrededor de 10 especies. Estos nemátodos se diferencian de otros principalmente, por la típica estructura de la cabeza y por la

1. Contribución del Programa Nacional de Entomología del ICA.
2. Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Estación Experimental "Tulio Ospina" ICA, Apartado Aéreo 51764, Medellín, Colombia.

forma de la cola y la genitalia de los machos (Welch 1963). De la especie *N. carpocapsae* se conocen actualmente tres razas, la DD-136, la Checoslovaca y la raza rusa referida como "raza agriotos" que fue encontrada recientemente por Poinar et al (1971). Se ha demostrado que la bacteria asociada con estas razas es la misma.

El *N. carpocapsae* ataca gran número de insectos masticadores, variando su grado de efectividad de acuerdo al insecto (Poinar, 1971). Se han desarrollado técnicas para la producción masiva de este nemátodo usando larvas de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Dutky et al, 1964) y alimento para perros (House et al, 1955) con excelentes resultados.

El nemátodo DD-136 ha sido utilizado en ensayos de campo (Drooz, 1960) y en pequeña escala comercial para el control de insectos plagas de cultivos agrícolas (Dutky, 1959; Welch y Briand, 1961 a, b). El principal problema en los ensayos de campo ha sido la humedad, ya que el nemátodo requiere altos contenidos de humedad para trabajar exitosamente. Webster y Bronskill (1968) obtuvieron buenos resultados en ensayos de laboratorio mediante la adición de una sustancia retenedora de agua, un retardante de la evaporación y un surfactante. Ellos lograron así aumentar el promedio de mortalidad de las larvas de *Pristiphora erichsonii* (Htg.) de 24 a 90 o/o.

Recientemente, Simons y Poinar (1973) demostraron que los estados juveniles infectivos de *N. carpocapsae* son capaces de sobrevivir humedades relativas muy por debajo del punto de marchitamiento de las plantas. Ellos sugieren que la aplicación de los nemátodos neoaplectanidos al suelo es más práctica que la aplicación a las partes aéreas de las plantas donde pueden estar sometidos a una rápida y letal desecación.

MATERIALES Y METODOS

A. Multiplicación del nemátodo:

En apiarios comerciales en Santa Fé de Antioquia se colectaron larvas de la polilla de la cera, *G. mellonella* y se llevaron al laboratorio de Entomología de la Estación Experimental "Tulio Ospina" del ICA donde se alimentaron con una dieta artificial, elaborada en base a la desarrollada por Beck

(1960), y la que se presenta a continuación con los siguientes ingredientes:

Ingredientes	Concentración
	mg/g
Miel de abeja colada	236
Glicerol	207
Agua	94
Cereal para bebés (Pablum)	322
Levadura de cerveza, en polvo	94
Cera de abeja, amarilla	47

Total	1000

Para prepararla se procedió así: El cereal, la levadura en polvo y la cera de abeja se mezclaron con suficiente éter etílico para disolver la cera.

Después de mezclados totalmente y una vez evaporado el éter, el cereal y la levadura quedaron uniformemente cubiertos con la cera de abeja. Posteriormente, se unieron la miel, el glicerol y el agua, mezcla que se adicionó a los ingredientes secos, mezclándolos completamente. Una vez lista la dieta se refrigeró por 24 horas, para disminuir su pegajosidad y tornarla más friable.

Se logró así establecer un cultivo permanente del insecto, el cual se utilizó para la multiplicación del nemátodo. El nemátodo usado fue *Neoaplectana carpocapsae* raza DD-136 proveniente de la Universidad de Wisconsin. Las formas encapsuladas del segundo estado juvenil del nemátodo se conservaron en una solución de formalina al 0.1 o/o mantenida en la nevera a 7° C.

Para infectar las larvas de *G. mellonella* se colocaron 4 ml de la suspensión de nemátodos en un plato de petri con dos hojas de papel filtro, en el fondo (Fig. 1a); luego en cada plato se colocaron unas 10 larvas próximas a empupar y se cubrió (Figs. 1b, 1c); después de unos dos o tres días, las larvas se transfirieron a una trampa, consistente en un plato de petri colocado en posición invertida dentro de un recipiente grande; el plato de petri se cubrió con una hoja de papel filtro de 12,5 cm de diámetro y el recipiente se llenó con suficiente solución de formalina al 0.1 o/o hasta casi cubrir el plato de petri (Fig. 1d). Al cabo de unos 10 días, los segundos estados juveniles migraron de las larvas desintegradas al líquido del recipiente a través de la superficie húmeda del papel filtro. Luego de esta trampa los juveniles se transfirieron y almacenaron en una ne-

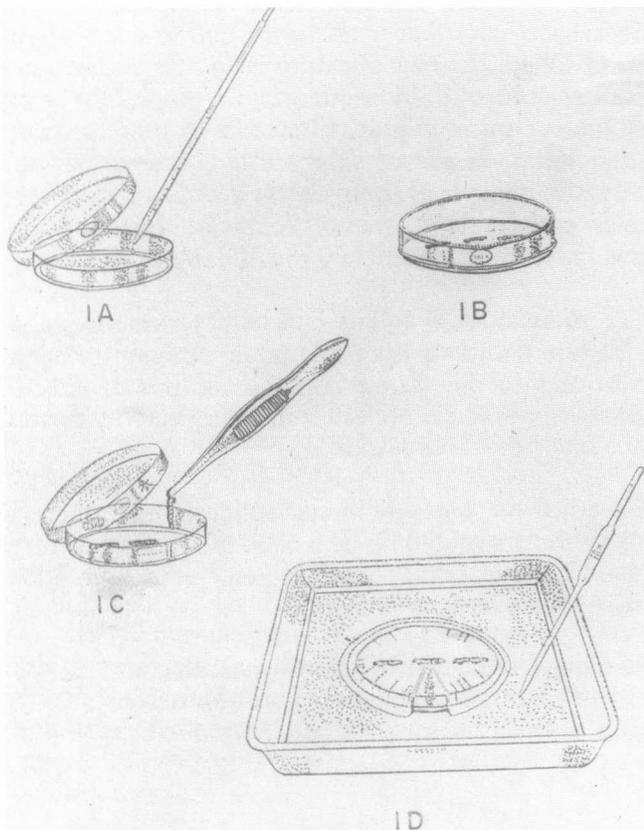


FIGURA 1. Método para la propagación del *Neoaplectana carpocapsae*:
 a) Infección de las larvas con la suspensión del nemátodo
 b) Introducción de las larvas en el plato de petri
 c) Transferencia de las larvas una vez muertas
 d) Recipiente trampa, con un plato de petri en posición invertida y sobre él las larvas. De este recipiente se colectan los nemátodos producidos.

(Adaptado de Martignoni y Steinhaus, 1961).

vera en erlenmeyers taponados con algodón.

Se llevó un registro sobre el número de nemátodos producidos por cada larva de *G.mellonella*.

B. Estudios de patogenicidad con larvas, prepupas y pupas de *O. trychiata*:

Se colectaron en el campo larvas de tercero, cuarto y quinto ínstar así como prepupas y pupas del medidor gigante del ciprés. De cada uno de los ínstaes se colocaron cinco larvas en recipientes de vidrio de un galón de capacidad, al cual se había introducido follaje de ciprés; para cada ínstar se hicieron cinco replicas para un total de 25 larvas por ínstar. Luego se asperjó el follaje del ciprés con nemátodos, simulando una aspersión en el campo. Para el caso de las prepupas y pupas, que

normalmente se encuentran en el suelo, se simuló el ambiente colocando cinco de cada una en recipientes de vidrio cubriéndolas con aserrín. La aspersión de nemátodos se hizo sobre el aserrín humedecido. Por cada estado se prepararon cinco replicas.

Todas las aspersiones con nemátodos se hicieron utilizando una concentración de 470 nemátodos por mililitro y empleando 8 ml por recipiente.

Una vez que las larvas murieron, fueron trasladadas a recipientes trampas, tal como se hizo con *G. mellonella*. También se llevaron registros periódicos sobre mortalidad y producción de nemátodos.

Para evaluar el número de nemátodos presentes en cada cosecha se tomaron dos muestras de 1,0 ml de la suspensión del nemátodo y se contó en un vidrio de reloj. Este resultado se promedió y relacionó con el volumen total de la suspensión y el número total de larvas de *G. mellonella* y *O. trychiata*.

C. Aislamiento de la bacteria *A. nematophilus*:

Se emplearon dos técnicas diferentes. En el primer procedimiento, las larvas de *O. trychiata* se infectaron con DD-136 como se indicó anteriormente. Después de 24 horas, cuando las larvas habían muerto por la acción del nemátodo, éstas se esterilizaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio por cinco minutos. Luego se maceraron las larvas en 1,0 ml de agua destilada. Una alícuota de esta suspensión se cultivó en agar nutritivo incubando los platos a 30° C, y haciendo observaciones diarias para detectar cualquier crecimiento bacteriano.

En el otro procedimiento se siguió la técnica descrita por Poinar (1966). Las formas juveniles infectivas de DD-136 se colectaron de larvas de *O. trychiata* infectadas las cuales se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio.

Luego se centrifugó una alícuota del nemátodo a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó la parte superior, quedando los nemátodos concentrados en el fondo. Estos se transfirieron a una lamini-lla cóncava esterilizada a la cual se la adicionó hemolinfa de *O. trychiata*. En caso de estar la bacteria en el nemátodo, es liberada en 24 horas en la hemolinfa. Al cabo de 48 horas se tomaron muestras de este cultivo y se inocularon en agar nutritivo para observar crecimientos bacteriales.

RESULTADOS Y DISCUSION

La cría masiva de *G. mellonella* fué bastante exitosa. La manipulación de los insectos es fácil y la dieta empleada es barata y eficiente, lo cual facilita la producción masiva del nemátodo para usarlo en una forma comercial en el campo.

El nemátodo *N. carpocapsae* raza DD-136, ataca las larvas y el estado de prepupa del *O. trychiata*, no así las pupas. Se observó que algunas prepupas atacadas alcanzan a empupar pero mueren antes de emerger el adulto por la acción del nemátodo y la bacteria mutualística *A. nematophilus*. La eficiencia del nemátodo es mayor en larvas de último instar y en las prepupas. Como se puede apreciar en la Tabla 1 la mayor producción de nemátodos se obtuvo en el quinto instar con un promedio de 28.380 nemátodos por larva siendo superada por el estado de prepupa con el que se obtuvo un promedio de 44.761 nemátodos por cada prepupa. A pesar de ser ésta una alta producción no es comparable con la obtenida usando prepupas de *G. mellonella*, que produjeron 60.378 nemátodos por prepupa (Tabla 2).

No se considera práctico hacer las aspersiones del nemátodo para atacar las larvas que se encuentren en el follaje. Es más eficiente dirigir las aspersiones para el control del insecto cuando empiece a bajar al suelo para empupar. El estado de prepupa, por su quietud, es el más susceptible al ataque del nemátodo; además el suelo de las plantaciones forestales conserva una mayor humedad que permite una mayor supervivencia y movilidad del nemátodo

Las aspersiones al follaje con nemátodos son poco efectivas debido a la dificultad de obtener un buen cubrimiento del follaje con los equipos de aplicación disponibles y por la rápida desecación y posterior muerte del nemátodo.

Sin embargo, antes de iniciar aplicaciones comerciales es indispensable llevar a cabo ensayos de campo con el fin de comprobar los resultados obtenidos bajo condiciones simuladas.

El almacenamiento de las formas juveniles del *N. carpocapsae* se puede hacer en una nevera a 7° C, suspendiéndolas en una solución de formalina al

Tabla 1: Número promedio de *Neoaplectana carpocapsae* producidos por cada larva de tercero, cuarto, quinto instar y por cada prepupa de *O. trychiata* obtenido al tratar 25 especímenes por prueba.

Días después de la infección inicial	No. total de ml. colectados	No. promedio por ml.	No. promedio de nemátodos por espécimen
TERCER INSTAR			
16	100	1676	6704
55	150	312	1872
82	150	54	324
			Total
CUARTO INSTAR			
16	80	5024	16077
55	150	228	1368
82	150	65	390
			Total
QUINTO INSTAR			
16	150	3736	22416
55	150	867	5202
82	150	127	762
			Total
PREPUPA			
16	150	4644	31663
55	150	1216	8290
82	150	720	4808
			Total
			44761

Tabla 2: Número promedio de *Neoaplectana carpocapsae* producidos por cada prepupa de *Galleria mellonella*, obtenido al tratar 51 prepupas.

Días después de la infección inicial	No. Total de ml. colectados	No. promedio por ml.	No. promedio de nemátodos por prepupa
12	200	4900	19.200
14	380	1400	9.537
19	383	1930	14.495
21	282	1240	6.856
26	290	1810	10.290
			Total
			60.378

0.1 o/o, dentro de un recipiente de vidrio taponado con algodón. En esta forma ha sido posible mantener nemátodos vivos por más de un año.

La bacteria mutualística *A. nematophilus* pudo aislarse con ambos procedimientos. Esta bacteria crece formando a las 24 horas colonias grises circulares, de 1,0 mm de diámetro, convexas y con márgenes irregulares. Los análisis de caracterización hechos a las 24 horas de crecimiento están de acuerdo con las características descritas por Poinar y Thomas (1965) y Poinar et al (1971) para *A. nematophilus*.

RESUMEN

El nemátodo *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, raza DD-136, fue patogénico a larvas y prepupas de *Oxydia trychiata* (Guenée) bajo condiciones simuladas de campo. La técnica presentada para la producción masiva del nemátodo indica que el nemátodo se puede producir económicamente en forma comercial.

Es indispensable realizar ensayos de campo para corroborar los resultados obtenidos bajo condiciones simuladas. Sin embargo, se cree que los suelos de las plantaciones de ciprés proporcionan la humedad necesaria para la supervivencia del nemátodo, condición crítica que ha limitado el uso del *N. carpocapsae* en muchos cultivos.

SUMMARY

The nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser strain DD-136, was pathogenic to larvae and prepupae of the forest defoliator *Oxydia trychiata* (Guenée) under simulated field conditions. The

technique presented to mass produce the nematode is considered useful and economical its commercial production.

It is necessary to carry out field experiments to corroborate the results obtained under simulated conditions. However, it is believed that the soil of pine plantations have the humidity required for the survival of the nematode a critical condition that has limited the use of *N. carpocapsae* in many crops.

BIBLIOGRAFIA

BECK, S. D. 1960. Growth and development of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleridae). Trans. Wis. Acad. Sci. Arts. Lett. 49: 137-48.

DROOZ, A. T. 1960. The larch sawfly. Its biology and control. U.S.D.A. Tech. Bull. 1212. 52 p;

DUTKY, S. R. 1959. Insect microbiology. Advan. Appl. Microbiol. 1 : 175-200.

-----and W. S. HOUGH. 1955. Note on a parasitic nematode from codling moth larvae *Carpocapsa pomonella*. Proc. Entomol. Soc. Wash. 57: 244.

-----, J. V. THOMPSON and G. E. CANTWELL. 1964. A Technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. J. Insect Path. 6: 417-22.

HOUSE, H. L., H.E. WELCH and T. R. CLEUGH. 1955. Food medium of prepared dog biscuit for the mass propagation of the nematode DD-136 (Nematoda: Steinernematidae). Nature 4986: 847.

- MARTIGNOMI, M. E. and E. A. STEINHAUS. 1961. Laboratory exercises in insect microbiology and insect pathology. Burgess Publ. Co, Minneapolis. 63 p.
- POINAR, G. O. Jr. 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. *Nematologica* 12: 105-8.
- POINAR, G. O. Jr. 1967. Description and taxonomic position of the DD-136 nematode and its relationship to *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 34: 199-209.
- POINAR, G. O. Jr. 1971 Use of nematodes for biological control of insects. *In* Burges, A. D. and N. W. Hussey, Eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press. New York. 181-201
- , and G. M. THOMAS. 1965. A new bacterium *Achromobacter nematophilus* sp. nov. (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) associated with a nematode. *Intern. Bull. Bacter. Nomen. Taxon.* 15: 249-52.
- , and G. M. THOMAS. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136. *Parasitology* 56: 385-90.
- , G. M. THOMAS, G. V. VEREMTSCHUCK and D. E. PINNOCK. 1971. Further characterization of *Achromobacter nematophilus* from American and Soviet populations of the nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21: 78-82.
- SIMONS, W. R. and G. O. POINAR. 1973. The ability of *Neoaplectana carpocapsae* (Steinernematidae: Nematodea) to survive extended periods of desiccation. *J. Invertebr. Path.* 22: 228-30.
- WEBSTER, J. M. and BRONSKILL, J. F. 1968. Use of Gelgard M and evaporation retardant to facilitate control of larch sawfly by a nematode bacterium complex. *J. Econ. Entomol.* 61: 1370 - 73.
- WELCH, H. E. 1963. Nematode infections. *In* E.A. Steinhaus, Ed. *Insect Pathology*. Vol. 2. Academic Press. 363 - 392 p.
- , and L. J. BRIAND. 1961a. Tests of the nematode DD-136 and an associated bacterium for control of the colorado potato beetle, *Lepidotarsa decemlineata*. *Can. Entomol.* 93: 759 - 63.
- , and L. J. BRIAND. 1961b. Field experiment on the use of a nematode for the control of vegetable crop insects. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 91: 197 - 202.