

DIFERENCIAS INTER E INTRAESPECIFICAS EN LA CAPACIDAD INFECTIVA DE POBLACIONES DE *HETERORHABDITIS* Y *STEINERNEMA* AISLADOS EN ARGENTINA[†]

M. M. A. de Doucet, M. E. Doucet y K. Nienstedt

Laboratorio de Nematología, Centro de Zoología Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 122, 5000 Córdoba, Argentina.

RESUMEN

M. M. A. de Doucet, M. E. Doucet y K. Nienstedt. 1992. Diferencias inter e intraespecíficas en la capacidad infectiva de poblaciones de *Heterorhabditis* y *Steinernema* aislados en Argentina. *Nematropica* 22:237-242.

Se evaluó en condiciones de laboratorio (25 C) la capacidad infectiva de tres nematodos entomopatógenos aislados en Córdoba, Argentina: *Steinernema rara* (Doucet, 1986) Poinar, 1990; *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Poinar, 1990; y dos poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 aisladas de dos localidades diferentes en Córdoba, Argentina. También se comparó la capacidad infectiva de los nematodos provenientes de generaciones hermafrodita y anfimictica de *H. bacteriophora* de una de las localidades. Se utilizó larvas de *Galleria mellonella* como insecto huésped. Los resultados obtenidos indican que la población de *H. bacteriophora* proveniente de la localidad de Oliva se destaca por su mayor capacidad infectiva respecto a las restantes especies ($DL_{50} = 3-5$). Entre *S. carpocapsae* ($DL_{50} = 4-11$), *S. rara* ($DL_{50} = 5-13$) y *H. bacteriophora* provenientes de la localidad de Río Cuarto ($DL_{50} = 5-15$) no se evidenciaron diferencias significativas. Juveniles infectivos provenientes de hembras hermafroditas y anfimicticas de *H. bacteriophora* no mostraron diferencias significativas en su infectividad.

Palabras clave: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *S. rara*, capacidad infectiva, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

M. M. A. de Doucet, M. E. Doucet, and K. Nienstedt. 1992. Inter and intraspecific differences in the infective capacity of populations of *Heterorhabditis* and *Steinernema* isolated in Argentina. *Nematropica* 22:237-242.

The infectivity of the entomophagous nematodes *Steinernema rara* (Doucet, 1986) Poinar, 1990, *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Poinar, 1990, and two populations of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975, isolated from Córdoba, Argentina, was compared under laboratory conditions at 25 C. Infectivity also was compared between infective juveniles obtained from hermaphroditic and amphimictic females of one population of *H. bacteriophora*. *Galleria mellonella* was used as a host. Results indicated that *H. bacteriophora* from the locality of Oliva had a higher infectivity rate ($LD_{50} = 3-5$) than the other species. There were no differences between *S. carpocapsae* ($LD_{50} = 4-11$), *S. rara* ($LD_{50} = 5-13$) and *H. bacteriophora* ($LD_{50} = 5-15$) from Río Cuarto locality. Infective juveniles derived from hermaphroditic and amphimictic females had the same rate of infectivity.

Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *S. rara*, infectivity, *Galleria mellonella*.

INTRODUCCION

Los nematodos pertenecientes a los géneros *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) y *Steinernema* (Steinernematidae) son parásitos obligados de insectos. La

presencia de sólo un juvenil infectivo (JI) dentro del huésped, causa su muerte a las pocas horas de haber penetrado. Por ello, estos nematodos son considerados interesantes agentes de control biológico (10,17,21).

[†]Este trabajo fue realizado con fondos otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Res. No. 738/91) y por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR, Res. No. 735/91), Argentina.

Dada la importancia práctica de estos nematodos, es preciso seleccionar las especies que mejor se adapten a las condiciones requeridas en cada caso. En consecuencia, las investigaciones se orientan hacia la búsqueda de nuevas especies y/o poblaciones y al conocimiento de sus características bioecológicas, siendo una de las principales la capacidad infectiva (9,10,17). Estudios referidos a esta característica en especies y/o poblaciones aisladas en el hemisferio norte, Australia y Nueva Zelanda, han evidenciado una gran variabilidad intra e interespecífica (2,12).

En el presente trabajo, se compara la capacidad infectiva de especies y poblaciones de nematodos entomopatógenos aislados de suelos agrícolas de Córdoba, Argentina, así como de juveniles infectivos provenientes de las generaciones anfimíctica y hermafrodita.

MATERIALES Y METODOS

Las especies de nematodos estudiadas fueron: *Steinernema rara* (Doucet, 1986) Poinar, 1990; *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Poinar, 1990; y dos poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 denominadas en este trabajo según su localidad de origen (Río Cuarto = RIV y Oliva = OLI). Los nematodos fueron aislados de suelos agrícolas de la Provincia de Córdoba (6) y mantenidos en cultivos puros desarrollados de acuerdo a técnicas convencionales (8,16). Los juveniles infectivos (JI) utilizados, contaban entre una semana y dos meses desde la fecha de recolección.

Para evaluar la infectividad entre los JI originados en diferentes generaciones, se utilizó la población de *H. bacteriophora* RIV. Los JI provenientes de las generaciones hermafrodita (JIH) y anfimíctica (JIA) se recuperaron de hem-

bras maduras de ambas generaciones, de las que se extrajeron los JI correspondientes (7).

El insecto huésped utilizado fue *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) criado en laboratorio y alimentado *ad libitum* con polen y cera. Para las pruebas de infectividad se emplearon larvas de 0.1 a 0.2 gramos de peso.

Los nematodos en concentraciones de: 2, 4, 8, 16 y 32 juveniles se pusieron en contacto con una larva de insecto. Cada larva de insecto se acondicionó en tubos cónicos de centrifuga (de polipropileno), de 1.5 ml de capacidad (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, U.S.A.), a los que se les perforó la tapa para permitir el paso del aire. Los tubos se rellenaron parcialmente con 1.12 ± 0.11 gramos de arena, de las siguientes características granulométricas: partículas $< 150 \mu\text{m} = 0.8\%$; $150-300 \mu\text{m} = 48.3\%$; $300-850 \mu\text{m} = 50.7\%$. El porcentaje de saturación es de 29.6. La arena se humedeció con agua hasta un valor de 17% al momento de introducir los JI. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a 25 C. Transcurridos tres días se contabilizó el número de insectos muertos.

Para cada combinación (concentración de juveniles infectivos y especie de nematodo), se prepararon diez y nueve tubos. Se calcularon los porcentajes de mortalidad y los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀) con sus correspondientes intervalos de confianza mediante análisis Probit (3,11). Este método, no permitió determinar la DL₅₀ en los casos de JIH y JIA de *H. bacteriophora* por cuanto la correspondencia entre los datos experimentales y la recta de regresión calculada no fue significativa (3). Las posibles diferencias entre esos dos tipos de larvas, se evaluaron mediante ANOVA de dos factores (22). Para ello, se repitieron los ex-

perimentos tres veces, con tres tubos en cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de mortalidad obtenidos para las diferentes especies de nematodos y los intervalos de confianza de las DL₅₀ se resumen en el Cuadro 1. Se observa que las DL₅₀ varían entre las especies así como entre las poblaciones de *Heterorhabditis*. Para la población de *H. bacteriophora* OLI se manifiesta una tendencia a una mayor capacidad infectiva en relación con las demás, tal como lo indican los valores de DL₅₀ (Cuadro 1; Fig. 1).

Los porcentajes de mortalidad ocasionados por los JIH y JIA de *H. bacteriophora* RIV se representan en la Fig. 2. Los valores calculados a partir de los datos experimentales no mostraron diferencias.

La capacidad infectiva de nematodos entomopatógenos está condicionada principalmente por la capacidad de sus JI en detectar la presencia de un insecto, moverse por el sustrato hasta alcanzarlo y penetrar en su interior (10). Diferencias en al menos uno de esos aspectos, indicarían capacidades infectivas dis-

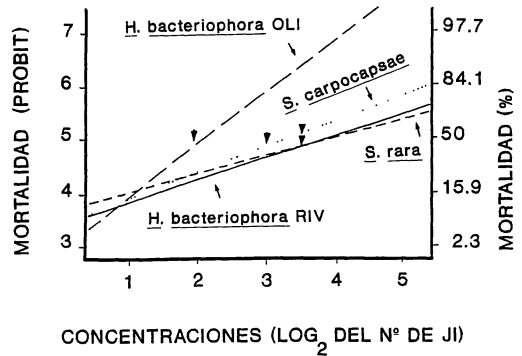


Fig. 1. Rectas de regresión de mortalidad/concentraciones y DL₅₀ (triángulo) correspondientes a *Heterorhabditis bacteriophora* OLI, *H. bacteriophora* RIV, *Steinernema rara* y *S. carpocapsae* sobre *Galleria mellonella*.

tintas. Por otro lado, existen condiciones ambientales en las que la movilización de las JI a través de un sustrato es más eficiente. Así, ha sido demostrado que la temperatura, la humedad y la porosidad del sustrato constituyen variables de importancia (10,12).

En el caso particular del presente estudio, la distancia entre un JI y su huésped nunca fue superior a los 3 cm. Debido a que los JI son capaces de localizar un insecto hasta una distancia de 14 cm (11,14,19,20), es válido inferir que

Cuadro 1. Capacidad infectiva de dos poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* y dos especies de *Steinernema* en diferentes concentraciones, frente a *Galleria mellonella*.

Concentración (Número de nematodos/insecto)	Mortalidad (%) ^y			
	<i>Heterorhabditis</i> ^z		<i>Steinernema</i>	
	OLI	RIV	<i>S. rara</i>	<i>S. carpocapsae</i>
2	20	1	25	25
4	55	40	24	30
8	85	63	63	50
16	100	50	75	75
32	—	100	63	100
DL ₅₀ :	4(3-5)	9(5-15)	8(5-13)	7(4-11)

^yBasado en un total de 95 insectos.

^zOLI, RIV: Poblaciones de *Heterorhabditis* provenientes de Oliva y Río Cuarto, respectivamente.

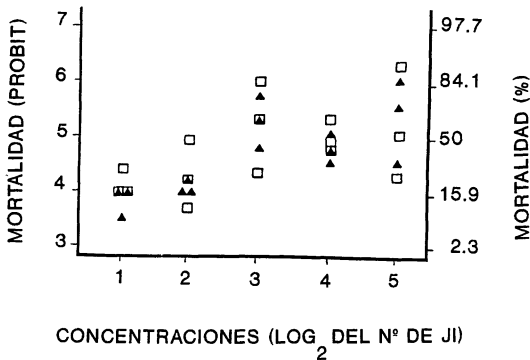


Fig. 2. Mortalidad de *Galleria mellonella* producida por diferentes concentraciones de juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* (localidad Río Cuarto) provenientes de las generaciones hermafrodita (cuadro) y anfimíctica (triángulo).

la detección del insecto se llevó a cabo. La temperatura a la que fueron sometidos los insectos y nematodos, es la empleada en casos en los que la infección tuvo lugar (5,6). En cuanto a la humedad, ha sido demostrado que la infección se produce con mayor facilidad en suelos arenosos, incluso próximos a la saturación (10,12). Por lo tanto, las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos fueron óptimas y los resultados obtenidos no son consecuencia de factores del medio. Esto indicaría que la población de *H. bacteriophora* OLI posee características propias que la hacen más infectiva que las demás. Se asume entonces que esas características están relacionadas con aspectos tales como: capacidad de penetración, toxicidad y agresividad.

Se ha observado que la penetración de los juveniles infectivos de la Familia Heterorhabditidae se ve favorecida por la presencia de un diente cuticular localizado en la región cefálica, por lo cual pueden perforar la cutícula del huésped. Esto los diferenciaría de los estadios equivalentes de la Familia Steinernematidae, carentes de tal estructura (1,2). Sin

embargo estudios posteriores no evidenciaron diferencias en la capacidad de penetración de los JI de ambas Familias (13). Esta tendencia se refleja igualmente en el presente trabajo.

Los JIH y JIA de *Heterorhabditis* spp. tienen su origen en generaciones que se suceden en el interior de un mismo insecto huésped (4,23). Los JIH colonizan el medio; los JIA maduran en un medio ya utilizado, diferente cualitativamente y cuantitativamente en lo que hace a elementos nutrientes disponibles. Esto, condicionaría el tipo de generación que se desarrolla (18) habiéndose observado que los juveniles provenientes de dichas generaciones pueden ser diferenciados en base al análisis de sus caracteres morfométricos (7).

Por otro lado, ha sido demostrado que para otros nematodos entomopatógenos la calidad del sustrato sobre el que se alimentan influye notoriamente sobre el tamaño de los individuos, el tipo de reproducción y el sex-ratio (15,18). En el presente trabajo, no se observaron diferencias en cuanto a la capacidad infectiva de los JI provenientes de las generaciones hermafrodita y anfimíctica.

Desde un punto de vista práctico, si se demostrara que los JI de ambas generaciones son equivalentes en cuanto a su capacidad infectiva, sería indistinto el tipo de JI obtenido para una posterior utilización en control biológico. No obstante, si se piensa en la producción a gran escala de estas larvas, convendría criar las que primero se desarrollan (JIH) ya que necesitan de menos tiempo para su obtención, 8 vs. 14 días (4). Esto implica menor costo de producción al disminuir el tiempo de mantenimiento de los cultivos.

Los caracteres morfológicos y morfométricos de las dos poblaciones estudiadas de *H. bacteriophora* (RIV y OLI)

son similares (G. O. Poinar Jr., comunicación personal). Sin embargo, en estas poblaciones han sido detectadas diferencias respecto a la velocidad del ciclo de vida *in vivo* y a la capacidad de resistencia a las condiciones de almacenamiento de los JI (datos no publicados). A esto, se agrega la mayor capacidad infectiva de la población de *H. bacteriophora* OLI. Esta marcada tendencia sugiere que las poblaciones mencionadas podrían representar distintos biotipos; sus características biológicas precisas quedan por definir.

LITERATURA CITADA

1. BEDDING, R. A. y A. S. MOLYNEUX. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28:345-349.
2. BEDDING, R. A., A. S. MOLYNEUX y R. J. AKHURST. 1983. *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Experimental Parasitology* 55:249-257.
3. BONNIER, G. y O. TEDIN. 1966. Bioestadística. Acribia: Zaragoza, España. 223 pp.
4. DOUCET, M. M. A. de y G. O. POINAR. 1985. Estudio del ciclo de vida de una población de *Heterorhabditis* sp. proveniente de Río Cuarto, Provincia de Córdoba. *Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto* 5:253-258.
5. DOUCET, M. M. A. de. 1986. A new species of *Neoaplectana*, Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Córdoba, Argentina. *Revue de Nématologie* 9:317-323.
6. DOUCET, M. M. A. de. 1990. Nuevos datos de nematodos entomófagos en la Provincia de Córdoba, Argentina. *Nematropica* 20:4.
7. DOUCET, M. M. A. de, M. E. DOUCET y J. A. DI RIENZO. Discriminación entre las larvas infestantes de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975, según su generación de origen. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* (en prensa).
8. DUTKY, S. R., J. V. THOMPSON y G. E. CANTWELL. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Physiology* 6:417-422.
9. GAUGLER, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24:351-360.
10. GAUGLER, R. y H. K. KAYA. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press: Boca Raton, Florida. 365 pp.
11. GOLDSTEIN, A. 1964. Biostatistics: An Introductory Text. The Macmillan Company: New York. 272 pp.
12. MOLYNEUX, A. S. y R. A. BEDDING. 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly *Lucila cuprina*. *Nematologica* 30:358-365.
13. MRACEK, Z., R. HANZAL y D. KODRIK. 1988. Sites of penetration of juvenile Steinernematids and Heterorhabditids (Nematoda) into the larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 52:477-478.
14. MOYLE, P. L. y H. K. KAYA. 1981. Dispersal and infectivity on the entomogenous nematode *N. carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), in sand. *Journal of Nematology* 13:295-300.
15. PETERSEN, J. J. 1972. Factor affecting sex ratios of a mermitid parasite of mosquitoes. *Journal of Nematology* 4:83-87.
16. POINAR, G. O. Jr. 1975. Entomogenous Nematodes. E. J. Brill: Leiden. 317 pp.
17. POINAR, G. O. Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press: Boca Raton, Florida. 277 pp.
18. POINAR, G. O. Jr. y E. HANSEN. 1983. Sex and reproductive modifications in nematodes. *Helminthological Abstracts, Series B* 52:145-163.
19. SCHMIDT, J y J. N. ALL. 1978. Chemical attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to insect larvae. *Environmental Entomology* 7:605-607.
20. SCHMIDT, J. y J. N. ALL. 1979. Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. *Environmental Entomology* 8:55-61.
21. SIMONS, N. R. 1980. Control of insects with nematodes. Pp. 275-278 *en* Mink y Gruys, eds. *Integrated Control of Insect Pests in the Netherlands*. Pudoc: Wageningen.

22. SOKAL, R. R. y F. J. ROHLF. 1979. Biometría. H. Blume Ediciones: Madrid. 832 pp.
23. WOUTS, W. M. 1979. The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). Nematologica 25:191-202.

Recibido:
20.V.1992

Received:

Aceptado para publicación:
1.X.1992

Accepted for publication: