

Ensayos de laboratorio con una población de *Steinernema carpocapsae* (Filipjev) detectada en larvas de *Capnodis tenebrionis* L.

C. SANTOS LOBATÓN, J. R. GARCÍA VELA, M. P. LARA LÓPEZ y A. CANALES ROCA

Se ha evaluado el efecto de *Steinernema carpocapsae* (Filipjev) para conocer su potencial de control sobre varias especies de insectos. La cepa (SCG.2) fue obtenida en el medio natural parasitando larvas de *Capnodis tenebrionis* L.

Los ensayos se realizaron en placas de Petri, teniendo lugar el 100% de mortandad en los estados preimaginales. En el primer ensayo los cadáveres de los hospedadores fueron diseccionados para obtener los nematodos que después fueron conservados en una solución de formol al 0,1% y a 4 °C. Estos nematodos fueron utilizados en un segundo ensayo y los cadáveres de los hospedadores fueron depositados en placas de Petri sobre papel de filtro a 20 °C para realizar observaciones intermitentes de la emergencia de los nematodos a partir de las 24 horas de la muerte del hospedador.

Los resultados obtenidos en varios imagos indican que éstos pueden servir de mecanismo para la dispersión de los nematodos.

C. SANTOS LOBATÓN: Laboratorio de Zoología Aplicada. Dpto. de Fisiología y Biología Animal. Fac. de Biología. Univ. de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.
J. R. GARCÍA VELA, M. P. LARA LÓPEZ L. y A. CANALES ROCA: Rhône-Poulenc Agro S.U. Centro de Investigación Agrícola. 41209 Torre de la Reina. Sevilla.

Palabras clave: *Steinernema carpocapsae*, *Capnodis tenebrionis*, cepa, control, ensayo, dispersión.

INTRODUCCIÓN

Un número elevado de insectos que constituyen plaga pasan una parte de su ciclo de vida en el suelo y éste ofrece un lugar excelente para la acción de los Nematodos Entomopatógenos (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) que también pueden actuar en la zona superficial y en las plantas, si las condiciones son favorables.

Si tenemos en cuenta que el suelo es un reservorio natural de estos nematodos (KLEIN, 1990) comprenderemos que resultan una atractiva alternativa a la aplicación de pesticidas químicos y un factor muy importante en los programas de Control Integrado (IPM). En esta línea, existe en la actualidad una tendencia progresiva a la utilización de biopesti-

cidas que se estima con un aumento del 15% en los próximos años, frente al descenso del 2% en el uso de los pesticidas químicos (LACEY y GOETTEL, 1995) y son muchos los autores que consideran el impacto y la proyección de futuro de los nematodos entre los biopesticidas (BARKER *et al.*, 1994).

Su compatibilidad con muchos pesticidas químicos que permite su utilización conjunta (ROVESTI *et al.*, 1990; COWLES y VILLANI, 1994) constituye una línea de investigación muy potenciada en la actualidad, despertando el interés de la industria porque además reúnen otras características tan deseables como la anterior, tales como su fácil producción masiva, su eficacia y la posibilidad de ser aplicados por métodos convencionales.

Los principales problemas que plantea la utilización de los nematodos entomopatógenos son su efectividad y pervivencia en el suelo ante factores limitantes o adversos entre los que están los enemigos naturales, fundamentalmente microartrópodos (EPSKY *et al.*, 1988; LEE y WIDDEN, 1996), y las condiciones del medio, de las que la temperatura es el factor limitante con implicaciones más importantes (HENNEBERRY *et al.*, 1996; BUHLER y GIBB, 1994). Todo esto indica el interés de detectar poblaciones naturales en suelos cultivados donde el nematodo está adaptado y además se conocerán nuevas especies o cepas con distintos grados de patogenicidad. En esta línea estamos realizando actualmente prospecciones en Andalucía Occidental para conocer los nematodos entomopatógenos, estudiar su rango de patogenicidad sobre especies plaga e intentar su cría masiva sobre ellas y sobre otras especies que permitan elevadas producciones y faciliten su inoculación y propagación en el medio donde actuarán como agentes controladores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos realizado ensayos con una población de *Steinernema carpocapsae* (SCG.2) detectada sobre larvas de *Capnodis tenebrionis* L. (Col.: Buprestidae) en la provincia de Sevilla.

En un primer ensayo obtuvimos los nematodos en cultivos realizados sobre larvas de *C. tenebrionis* aisladas del medio natural. Los nematodos obtenidos se conservaron en formol (0,1% a 4-6 °C) para ser utilizados en un segundo ensayo en el que también se utilizaron individuos obtenidos después de una rehidratación del medio en el que permanecían; con este método se recuperaron del 50 al 80% de los individuos.

En el segundo ensayo se utilizaron las formas infectivas obtenidas a partir del primero. Para esto, se procedió a un filtrado y fueron seleccionados por su aspecto intacto y motilidad normal de ondulaciones sinusoi-

dales; aspectos observados en un microscopio invertido (100x) tal como ha sido realizado por BADLEY *et al.* (1990).

Los ensayos de mortandad y estudios de producción de nematodos se realizaron sobre estados preimaginales de *C. tenebrionis*, *Spodoptera littoralis* Hübner, *Spodoptera exigua* Hübner, *Lobesia botrana* Den y Shiff, *Earias insulana* Boisduval y *Bombyx mori* L.

Los ensayos tuvieron lugar en placas de Petri de 90 mm. de diámetro, mantenidas en cámaras de cultivo a 20 ± 1 °C, con una humedad relativa del 60-70% y un fotoperiodo de 12:12 horas (luz:oscuridad). En cada ensayo se utilizaron diez placas de Petri para larvas y diez para pupas, depositando en cada caso cinco individuos sobre discos de papel de filtro a los que se había añadido cinco ml. de suspensión acuosa del nematodo (50 nematodos/ml.). Se realizaron controles cada 24 horas para ir recogiendo los individuos muertos, que eran depositados individualmente en placas de Petri, sobre papel de filtro húmedo, a fin de obtener separadamente los nematodos que iban emergiendo de cada uno de ellos.

También realizamos observaciones directas de la penetración de los nematodos, depositando en la superficie de las larvas y pupas una gota de agua que contenía uno o dos nematodos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad del nematodo

La mortandad resultó ser del 100% en todas las especies ensayadas y tuvo lugar entre las 24 y 48 horas posteriores a la introducción de los hospedadores en las placas de Petri. En las larvas en la que se observó directamente la penetración de los nematodos, la muerte tuvo lugar entre las 50 y 70 horas.

El porcentaje de mortandad es frecuente en ensayos de laboratorio tal y como han manifestado varios autores que han trabajado con distintas especies y cepas, utilizando

concentraciones de 100 nematodos/ml. (GLAZAR, CALPER y SHARON, 1991). En nuestro caso, hemos obtenido el mismo índice de mortandad con la mitad de concentración, resultado que se corresponde con los de otros autores que lo consiguen con pocos nematodos (MACVEAN y BREVER, 1981). Algunos autores como GARCÍA DEL PINO (1988) llegan a la conclusión de que el aumento en la concentración sólo influye en el número de días que transcurren hasta la emergencia de las formas infectivas.

En todas las especies ensayadas observamos melanización en toda la superficie corporal pero se muestra tardíamente en comparación con otros autores que la encuentran al día siguiente de la inoculación (BLOSSEY y EHLERS, 1991). En nuestros ensayos se mostró poco antes de emerger los nematodos en *Lobesia botrana* (Fig. 1); en las últimas etapas de la desintegración del cadáver, en *C. tenebrionis* y *B. mori* y a partir de las 48 horas en las restantes especies. En la Fig. 2 observamos los primeros nematodos que emergen, de segunda y tercera generación, a partir de *C. tenebrionis* sin ser evidente la melanización que se muestra más tarde (Fig. 3). No encontramos una zona preferente de salida aunque lo hicieron en mayores cantidades a través de las membranas, en el caso de las pupas (Fig. 4).



Fig. 1.-*L. Botrana* al empezar a emerger los nematodos.



Fig. 2.-Emergencia de nematodos en *C. tenebrionis*, sin melanización.

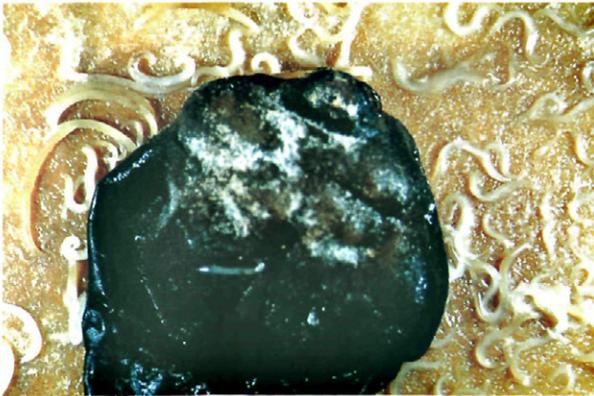


Fig. 3.-Fuerte melanización en *C. tenebrionis* con nematodos emergiendo.

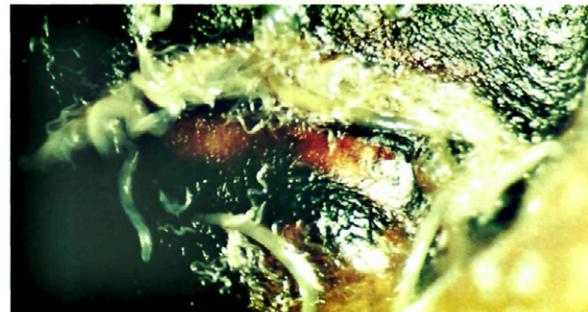


Fig. 4.-Detalle en pupa de *S. littoralis*.

No apreciamos diferencia entre la efectividad de los nematodos encontrados en el medio natural y las siguientes generaciones obtenidas a partir de éstos y que fueron conservados en formol o recuperados después de rehidratarlos. La recuperación de los conservados en formol resultó ser del 85% y la de los rehidratados del 50-80% lo que nos proporciona buenas expectativas para la realización de ensayos en campo con esta cepa.

Producción de nematodos

El mayor número de nematodos obtenido fue a partir de *B. mori*, seguido de *C. tenebrionis* (Fig. 5).

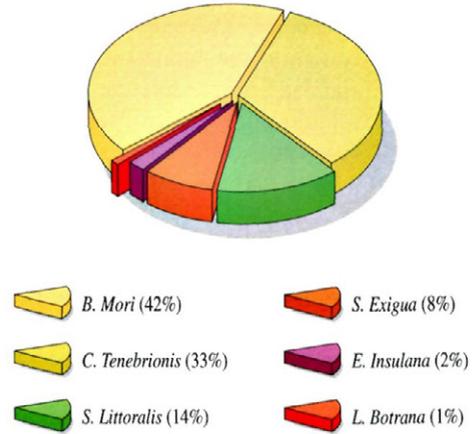


Fig. 5.—Nematodos obtenidos (%) en las distintas especies.

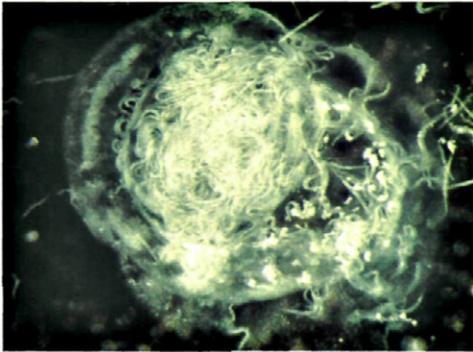


Fig. 6.—Hembra de 1ª generación con los individuos infectivos fuera.



Fig. 7.—Hembras de 2ª generación con formas infectivas en su interior.

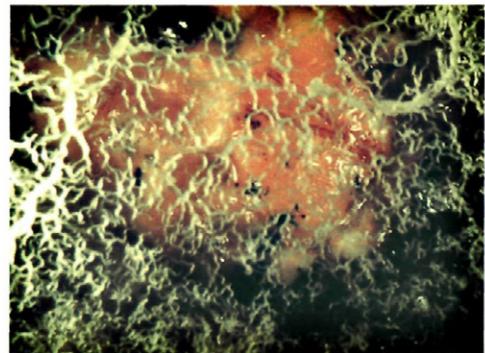


Fig. 8.—Nematodos desplazados en la tapa de una placa de Petri.

El número de nematodos obtenido puede resultar superior si se espera la emergencia de las formas infectivas a partir de las hembras localizadas en procesos de «endotoquia matricida» (Figs. 6 y 7) que eran separadas por filtrados. Algunas de estas hembras fueron localizadas en las tapas de las placas de Petri junto con individuos en distintas etapas del ciclo y machos, todos habían ascendido por evaporación (Fig. 8) y eran recogidos al mismo tiempo que los que estaban sobre el hospedador, en el papel de filtro y en el fondo de la placa.

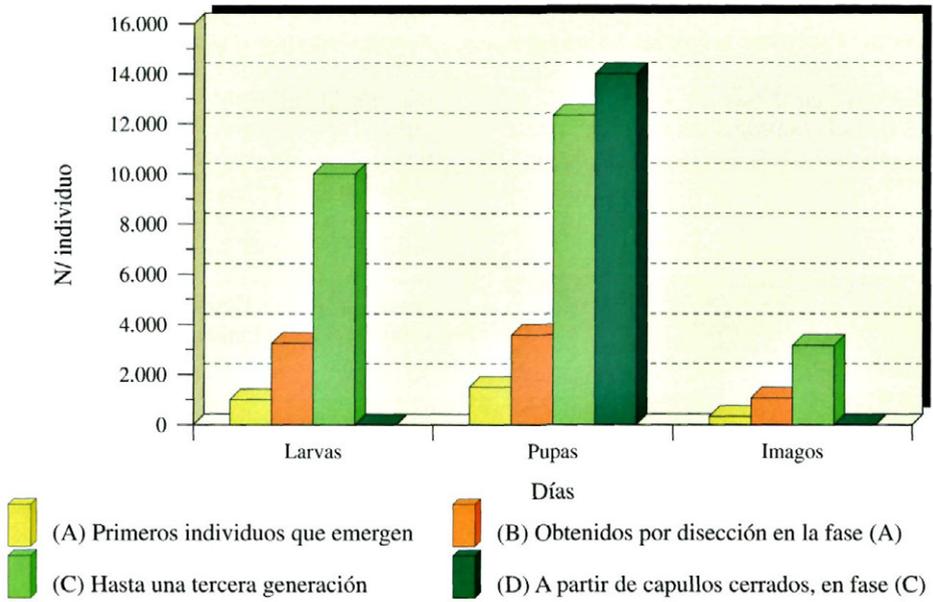


Fig. 9.-Nematodos obtenidos en los ensayos con *B. mori*.

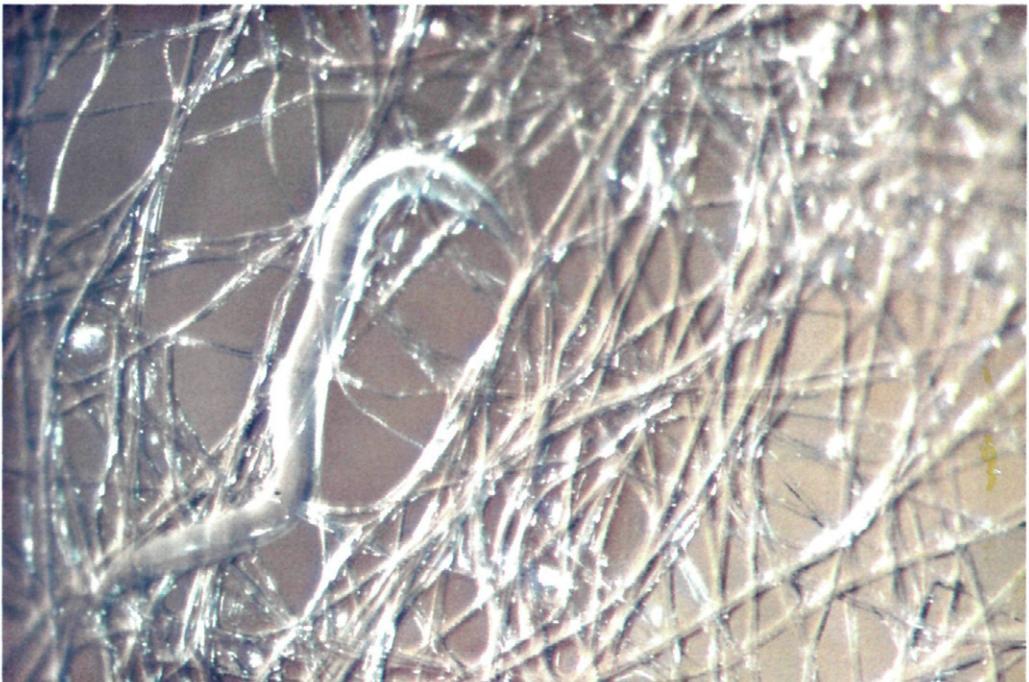
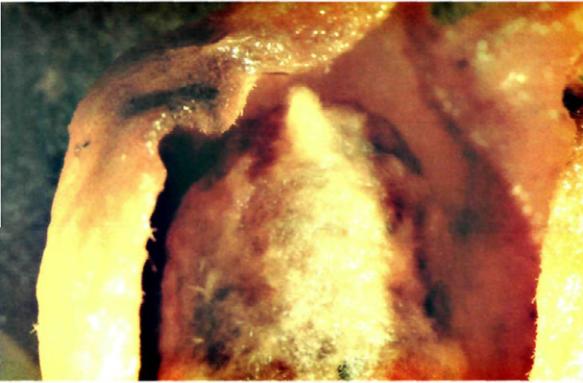


Fig. 10.-*S. Carpocapsae* (SCG.2) en un hilo de seda.

En *B. mori*, donde fueron repetidos los ensayos para infectar todas las etapas del ciclo, se comprobó que el nematodo actúa en todas salvo en la fase de huevo, resultando más elevada la producción en la etapa de pupa y superior a ésta la procedente de con-

taminar capullos cerrados (Fig. 9). Los nematodos no tuvieron dificultad en acceder al interior del capullo, deslizándose con facilidad por los hilos de seda (Fig. 10). Los capullos fueron abiertos en el momento de detectar la salida masiva de formas infectivas (Fig. 11).

Todos los ensayos nos muestran una posibilidad de obtener grandes cantidades de nematodos sobre estados preimaginales y conservarlos para su posterior utilización. Los imagos infectados, directamente o porque eclosionaron en los momentos iniciales de la infestación pueden ser tenidos en cuenta por la posibilidad de actuar como vectores y la limitada supervivencia después de la contaminación evitaría una propagación no deseada del nematodo.



INT.

EXT

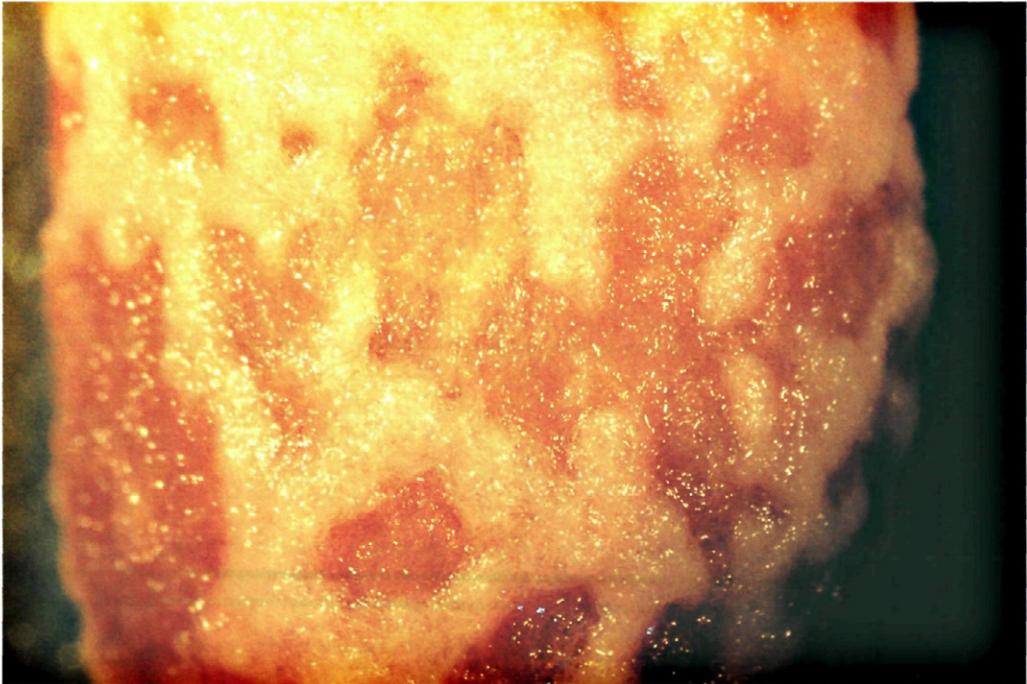


Fig. 11.—Emergencia masiva en capullos de *B. mori*.

ABSTRACT

SANTOS LOBATÓN, C.; GARCÍA VELA, J. R.; LARA LÓPEZ, M. P. y CANALES ROCA, A., 1998: Bioassays with a strain of *Steinernema carpocapsae* (Filipjev) detected on *Capnodis tenebrionis* L. Larvae. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(4): 679-686.

The effect of *Steinernema carpocapsae* (Filipjev) was evaluated for its potential to control several insect species. The strain (SCG.2) was obtained from natural medio parasitizing larvae and pupae of *Capnodis tenebrionis* L.

Bioassays was carried out using Petri plates and caused 100% of mortality on immature individuals. In the first assay hosts cadavers were dissected in order to obtain nematodes and they were dissected in order to obtain nematodes and they were conserved in 0,1 formaldehyde solution at 4 °C. These nematodes were used in a second assay and the cadavers were stored on moist filter paper in Petri plates at 20 ± 1 °C for intermitent observations on the hatching of nematodes up 24 hours after the host died.

Results obtained on several imagoes indicates that they could serve as a mechanism for this nematode dispersal.

Key words: *Steinernema carpocapsae*, *Capnodis tenebrionis*, strain, control, bioassay, dispersal.

REFERENCIAS

- BARQUER, K. R., et al., 1994: Plant and Soil Nematodes. Societal impact and Focus for the Future. *The Journal of Nematology* 26 (2): 127-137.
- BRADLEY, S. S.; HODSONG-SMITH, A.; POPIEL, I.; MINTER, D. M. y JAMES, E. R., 1990: Cryopreservation of the entomopathogenous nematode parasite *Steinernema feltiae* (= *Neoaplectana carpocapsae*) *Cryobiology* 27: 319-327.
- BUHLER, W. G. y GIBB, T., 1944: Persistence of *Steinernema carpocapsae* and *S. Glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) as measured by they control of black cutworm (Lepidoptera:Noctuidae) larvae in bentgrass. *J. Econ. Entomol.* 87 (3): 638-642.
- COWLES, R. S. y VILLANI, M. G., 1944: Soil interactions with chemical insecticides and Nematodes used for control of Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabeidae). *J. Econ. Entomol.* 87 (4): 1014-1021.
- EPSKY, N. D.; WALTER, D. E. y CAPINERA, J. L., 1988: Potencial role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) *J. Econ. Entomol.* 81: 821-825.
- GARCÍA DEL PINO, F., 1988: Susceptibilidad de las larvas de *Gortyna xanthenes* (Germar) (Lep. Noctuidae) al nematodo entomopatógeno *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Nematoda, Rhabditida) *Bol. San. Veg. Plagas.* 14: 119-126.
- GLAZAR, I.; CALPER, S. y SHARON, E., 1991: Virulence of the Nematode (Steinernematids and Heterorhabditids) – Bacteria (*Xenorhabdus* spp.) complex to the egyptian cotton leaf-worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 94-100.
- HENNEBERRY, J. J.; FORLOW, J. L.; BURKE, R. A. y LINDEGREN, J. E., 1996: Temperature effects on infection and mortality of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae by two entomopathogenic nematode species. *Environ. Entomol.* 25 (1): 179-183.
- KLEIN, G. M., 1990: Efficacy against soil-inhabiting insect-pest. pp. 195-214. In: R. Gaugler and H.K. Kaya [eds.], Entomopathogenic nematodes in biological control. C.R.C. Boca Raton, Fla.
- LACEY, L. A. y GOETTEL, 1995: Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st Century. *Entomophaga* 40 (1): 3-27.
- LEE, Q. y WIDDEN, P., 1996: *Folsonia candida* a “fungivorous” collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* 28 (415): 689-690.
- MACVEAN, C. M. y BREWER, J. M., 1981: Suitability of *Scolytus multistriatus* and *Dendroctonus ponderosae* as hosts for the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *J. Econ. Entomol.* 74: 601-607.
- ROVESTI, L.; FIORINI, T.; BETTINI, G.; WATSEYMNI, E. y TAGLIENTE, F., 1990: Compatibilità di *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp. con fitofarmaci. *Informatore Fitopatologico* 9: 55-61.

(Recepción: 12 enero 1998)

(Aceptación: 21 mayo 1998)

