POTENCIAL DE USO DE NEMTATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MÉXICO

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

DIRECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

De todos los nematodos estudiados para el control biológico de insectos, los pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son los que han despertado mayor interés por la información generada en el mundo, la cual ha crecido exponencialmente a partir de la década de los 80's. Estos agentes de control biológico son semejantes a los parasitoides en los que los inmaduros se desarrollan a expensas de un solo huésped, son ecológicamente similares a parasitoides y depredadores en que el hospedero eventualmente muere; sin embargo difieren de parasitoides y depredadores al menos dos aspectos: 1) el nematodo esta mutualísticamente asociado con un patógeno bacterial el cual mata al insecto huésped, y 2) la patogenicidad de la bacteria tiene una gran influencia en la eficiencia del sistema nematodo- bacteria (Ehler 1990).

Son además seguros a vertebrados, vegetales y otros organismos no blanco, por lo que están exentos de registro en EUA, son fácilmente aplicados utilizando equipo estándar de aspersión, compatibles con diversos plaguicidas y son factibles de selección genética. Debido a que sirven como vectores de las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son llamados entomopatógenos (Kaya y Gaugler 1993).

No obstante, a lo anterior, los resultados obtenidos en campo han sido constantes en la mayoría de los casos. En México, estos agentes de control biológico son poco conocidos y por lo tanto no han sido explotados en todo su potencial; el interés por su uso surge en los últimos años para utilizarlos contra insectos plaga del suelo y hábitat crípticos.

Cuadro 1. Especies de *Steinernema* y *Heterrhabditis* y sus respectivas bacterias simbióticas *Xenorhabdus* y *Phothorhabdus* (Modificado de Kaya y Gaugler 1993).

Géneros nemátodos	Especies de nematodos	Especies de Bacterias
*Steinernema**	*affinis*	*X. bovienii*
	anomali	No descrita
	carpocapse	*X. nematophilus*
	feltiae (=bibionis)	*X. bovienii*
	glaseri	*X. poinarii*
	intermedia	*X. bovienii*
	kraussei	*X. bovienii*
	kushidai	no descrita
	neocurtillis	no descrita
	rara	no descrita
	riobravis	no descrita
	ritteri	no descrita
	scapterisci	no descrita
	cubana	no descrita
	biconotum	no descrita
Heterorhabditis	*bacteriophora*	*P. luninescens*
	brevicaudis	*P. luninescens*
	indicus	*P. luninescens*
	hawaiiensis	*P. luninescens*
	meigidis	*P. luninescens*
	zealandica	*P. luninescens*
	meralatus	*P. luninescens*

* *Steinernema puertoricensis* y *S. longicaudum* son especies cercanas y su status taxonómico no ha sido clarificado (Nguyen y Smart 1996).

UBICACIÓN TAXONÓMICA

Los nemátodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae están ubicados en el Phyllum nemátoda, clase Secernentea y Orden Rhabditida (Taranda y Kaya 1993). La familia Steinernematidae contiene dos géneros, *Steinernema* y *Neosteinernema* de los cuales se han descrito 17 especies del primero y una del segundo. La familia Heterohabditidae es monogenerica describiéndose hasta ahora 7 especies de *Heterorhabditis* (Nguyen y Smart 1996).

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de steinernemátidos y heterorhabdítidos es simple e incluye el huevo, cuatro estados juveniles (separados por mudas) y el adulto. La infecciòn es iniciada por un juvenil especial de tercer estadio (figura 1). El juvenil infectivo o larva dauer esta morfológicamente adaptado para permanecer en el ambiente por un periodo prolongado mientras encuentra un insecto huésped (Woodring y Kaya 1988).

Los juveniles infectivos penetran al cuerpo del insecto huésped por aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) y menos comúnmente por heridas que les permite el acceso directo al homocele del huésped. Los heterorabditidos poseen además un diente terminal largo que puede ser utilizado para penetrar en áreas intersegmentales de la cutícula. La vía de penetración puede ser restringida dependiendo del estado de desarrollo del huésped; por ejemplo, en pupas los espiráculos son la única vía de entrada. En estados larvales de melonlóntidos los espiráculos están protegidos con placas las cuales sirven para evitar la entrada de patógenos especialmente nemátodos; en simúlidos, la ruta oral es la única forma de infección, la invasión oral no ocurre en insectos con valvas proventriculares escleotizadas como en las cucarachas (Ishibashi y Kondo 1990).

Figura 1. Juvenil infectivo de *Steinernema carpocapse*. Xn= Celulas de *Xenorhabdus nematophilus* en la porción ventricular del intestino. F= Faringe. Pe= Poro excretor. Rc= Restos de la cutícula del segundo estadio. I= Intestino. A= Ano.

Una vez en el interior del cuerpo del insecto, los juveniles infectivos penetran al homocele a través de la pared del intestino medio o tráqueas, posteriormente el insecto es inoculado con las bacterias *Xenorhabdus* (*Steinernema*) o *Photorhabdus* (*Heterorhabditis*), la bacteria prolifera, causa la muerte del insecto por septicemia en 24- 72 horas y establece condiciones favorables para la reproducción del nematodo (Georgis Hage 1991).

Una de las principales diferencias entre steinernemátidos y heterorabdítidos es el desarrollo posterior al estado infectivo. En *Steinernema* spp., el juvenil insectivo se desarrolla en macho o hembra pero nunca en hermafrodita (figura 2); en *Heterorhabditis* spp., cada juvenil infectivo se convierte en hermafrodita y nunca en macho o hembra. Sin embargo, la segunda generación (progiene de las hembras inicialmente formadas del estado infectivo) consiste de machos y hembras en ambas familias (Woodring y Kaya 1988). El ciclo de vida desde la infección del huésped por juveniles infectivos hasta el abandono del mismo por la nueva generación infectiva es entre 7 y 10 días (Kaya y Stimmann 1987). Se ha demostrado que altas densidades de población y/o falta de nutrientes inducen la formación de juveniles infectivos con la implicación de una feromona (Popiel y Hominick 1992).

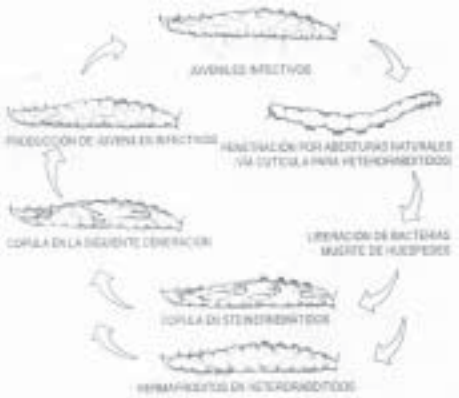

Figura 2. Ciclo de vida de *Steinernema* sp. y *Heterorhabditis* sp.

JUVENILES INFECTADOS Y SU BACTERIA SIMBIOTICA

El dauer es la única forma de vida libre, durante un periodo de búsqueda el nematodo no se alimenta por lo que utiliza las reservas de energía que almacenó previamente lo que le permite sobrevivir por largos periodos si las condiciones son favorables (Ishibashi y Kondo 1990).

El juvenil infectivo tiene mayor movilidad que el respectivo tercer estado juvenil de desarrollo normal, este atributo es una adaptación para su vida libre en la cual la orientación y movimiento para encontrar un huésped es crítica. Los dauer de *S. carpocapse* exhiben tactismo positivo a CO_2 y agregación en la fuente; por lo que se piensa que esto es importante para encontrar el huésped. Asimismo, el bióxido de carbono juega un papel importante en la agregación de juveniles infectivos de *S. glaseri* en las raíces de plantas, una respuesta que los coloca en la zona de alimentación del huésped. Los componentes fecales del huésped incluyendo ácido úrico, xanthina, allantoina, amonia y ácido argínico, también provocan la agregación de juveniles infectivos de *S. carpocapse* (Ishibashi y Kondo 1990).

Estudios taxonómicos confirman que cada especie de *Steinernema* y *Heterorhabditidae* tiene una asociación natural con una especie de *Xenorhabdus* o *Photorhabdus* respectivamente, no obstante una especie de bacteria puede estar asociada con más de una especie de nematodo (Cuadro 1). Esta interacción tiene facetas, aparentemente la bacteria, no sobrevive bien en agua o suero y no son patogénicas para insectos cuando son ingeridas por éstos; los nematodos proveen protección a la bacteria fuera del insecto huésped y un medio de transmisión del insecto muerto al homocele de un nuevo huésped; le proveen además de protección de algunas defensas del hospedero. La contribución de la bacteria es la producción de nutrientes al nematodo. Muchas especies de *Xenorhabdus* son altamente patogénicas cuando son introducidas en el homocele de larvas de *Galleria mellonella*, la patogenicidad de la bacteria depende de su habilidad para entrar y reproducirse en la hemolinfa del insecto (Akurst y Boemare 1990).

RANGO DE HUÉSPEDES Y USO

Bajo condiciones de laboratorio y en altas concentraciones, los steinernemátidos y heterorabdítidos pueden infectar un amplio rango de huéspedes incluyendo la mayoría de especies de insectos, extendiéndose también a otros invertebrados (Gastropoda, Symphyla, Arácnida, Crustácea y Diplopoda). Sin embargo, por comportamiento y barreras ecológicas, su efectividad se reduce a insectos que habitan en el suelo y habitats crípticos (Georgis y Hage 1991, Klein 1990, Begley 1990). Así por ejemplo, las larvas de lepidóteros que se alimentan del follaje son insectos altamente susceptibles a infecciones encajas petri pero pobremente impactadas en el campo, ya que los nematodos son rápidamente inactivados por condiciones ambientales extremas (Kaya y Gaugler 1993).

Larvas de *Galleria mellonela* (Lepidoptera: Pyralidae) son frecuentemente utilizadas por la disponibilidad, facilidad de cría, susceptibilidad y por ser un excelente huésped para la producción de nematodos. El promedio de producción de juveniles infectivos es de 30,000 a 50,000 por insecto, aunque se tienen reportes de producción de 200,000 de *S. feltiae* y 350,000 de *H. bacteriophora* en larvas del último instar de *G. mellonella* (Woodring y Kaya 1988).

Existen diferentes metodologías para la producción masiva *in vitro* de steinernemátidos y heterorabdítidos; de éstas, la técnica más aceptada es la desarrollada por Bedding (1981, 1984) utilizando viceras de pollo sobre esponja como sustrato, como contenedores se utilizan frascos de vidrio o bolsas esterizables. Es más recomendable iniciar los procesos de producción con frascos para después continuar con bolsas en las cuales se pueden obtener en promedio más de un billón de *S. feltiae*/bolsa.

Los nematodos pueden ser almacenados en agua destilada con dispersante al 1% para evitar que se adhieran a la pared del recipiente, cuando se tengan problemas de contaminación se podrá utilizar formalin al 0.1%. Cuando se almacenan sin aereación, la concentración no deberá ser mayor de 10,000- 20,000 nemátodos/ml y el grosor del agua no deberá ser más de 1cm. Concentraciones altas de nematodos (100,000 /ml) necesitarán aereación para lo cual se podrá utilizar una bomba de acuario. Los steinernemátidos pueden ser conservados por 6-12 meses a temperaturas de 4-10º C , en cambio los heterorabdítidos mantienen su virulencia cuando son almacenados a 10-15º C (Voodring y Kaya 1988).

Los juveniles infectivos pueden ser transportados como una pasta semisólida en esponja húmeda o algodón empacados con hielo. El transporte en agua no es recomendable ya que tienen una mejor aereación en algodón o esponja húmeda (Woodring y Kaya 1988).

FORMULACION Y APLICACIÓN

La formulación de nematodos entomopatógenos es amplia y delicada ya que esta relacionada con el proceso de producción y almacenamiento, así como la interacción del patógeno con plantas, insectos otros invertebrados, mamíferos, suelo, aire y agua. Los ingredientes utilizados en las formulaciones incluyen agentes biológicamente activos, arcillas, solventes surfactantes y polímeros. En general la formulación es requerida para estabilizar el producto y mejorar su eficacia en campo (Georgis 1990).

Los inertes utilizados para formular algunos nematodos disponibles comercialmente poseen propiedades que mejoran su manipulación, aplicación, persistencia y almacenamiento. Entre estas están el alginato, arcillas y gel de poliacrilamida. Estos acarreadores inmovilizan o desecan parcialmente los nematodos, reduciendo su metabolismo y mejorando su tolerancia a temperaturas extremas. Otra forma de formular es utilizando sustratos húmedos como esponjas, vermiculita y turba, pero su viabilidad declina rápidamente en cuartos fríos. (Popiel y Hominick 1992).

Los métodos de aplicación de nematodos entomopatógenos aparecen en el cuadro 2. Los nematodos pueden ser aplicados con el equipo común de agroquímicos incluyendo aspersoras pequeñas de presión, electrostáticas de ventilador y helicópteros. Los steinememátidos y heterobdítidos pueden resistir presiones de aplicación de 300 lb/pulgada cuadrada y ser liberadas con aspersoras comunes con aberturas de 50 micrones, sin embargo algunos equipos de aspersión producen una elevada cantidad de calor, temperaturas por encima de los 32º C que podrían afectar adversamente a los nematodos (Georgis 1990).

FORMULACION	METODOS DE APLICACION
Esponja de Polieter-Polierutano	Aspersión acuosa de los nematodos extraídos
Turba	Aspersión acuosa de nematodos y turba
Vermiculita	Aspersión acuosa de Nematodos extraídos
Arcillas	Aspersión acuosa de nematodos y arcillas
Cápsula de alignato	Dispersión de cápsulas o cápsulas en suspensión acuosa
Lámina de alignato	Aspersión acuosa después de la disolución de alignate
Poliacril amidas formadoras de gel	Aspersión acuosa de nematodos extraídos
Cebos	Dispersión de cebos.

Tomado de Georgis 1990.

BIBLIOGRAFÍA

Akust, R. J. & N. E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* . pp: 75-90. In: Gaugler, R.& H.K. Kaay (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Bedding. R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoplectona* and *Heterrhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pest. Nematológica 27: 109-114.

Bedding R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoplectana* spp and *Heterohabditis* spp. Ann. Appl. Biol. 104: 117-120.

Bedding. R. 1990. Logistic and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology intro developing countries. Pp 233- 248. In: Gaugier, R &H. K. Kaya (eds.) Entomopahogenic nematodes biological control CRC Press. Boca Raton FL 365 p.

Begey, J.W. 1990. Efficacy against insect in habitats other the soil. Pp: 215-231. In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Ehier, L.E. 1990. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. pp 1-19. In: Gaugler, R& H.K. Kaya (eds). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Georgis R. 1990. Formulation and application technology. Pp: 173-191. In: Gaugler, R & H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Georgis, R. & R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. J. Econ. Entomol. 84: 713- 720.

Georgis, R. & N.G.M. Hage 1991. Nematodes as biological insecticides. Pestic. Outlook 2: 29-32.

Ishibashi, N. 6 E. Kondo. 1990. Behavior of infective juveniles. Pp: 139-153. In: biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Kaya H. & R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Ann. Rev. Entomol. 38: 181- 206.

Kaya, H. & M. W. Simmann. 1987. Parasitic nematodes in biological control of insects pests. University of California, Berkely, CA. 2 p.

Klein, M.G. 1990. Efficacy against soil- in habiting insect pests. Pp: 195- 214. In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.

Nguyen, K. B. & G. C. Smart. 1996. Identification on entomopathogenic nematodes in the Steinememetidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). Journal of Nematology. 28 (3): 286-300.

Popiel L. & W. M. Hominick. 1992. Nematodes as biological control agents: Part. II Advances in Parasitology 31: 381- 433.

Tanada Y. & H. Kaya 1993. Nematodes, nematomorphs and Platyheiminthes pp: 459- 491. In: insect Pathology. Academic Press, San Diego, CA 666 p.

Woodring. J.L & H. Kaya. 1988. Steinenematid and heterorhabditis nematodes : a hanobook of biology and technique. Southem Cooperative Series Bullein 331. Arkansas Agriculture Experiment Station Fayettevilla, Arkansas 30 p.

SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL
Ing. Romárico Arroyo Marroquín
SUBSECRETARIO DE AGRICULTURA Y GANDERÍA
M.V.Z. Francisco José Gurría Treviño
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M.C. Luis Angel Villareal García
SUBDIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO
M.C. Hugo César Arredondo Bernal
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENTOMOPATÓGENOS
M.C. Víctor Manuel Hernández Velázquez

COMPILADORES:
M.C: Víctor Manuel Hernández Velázquez
M.C. Angélica María Berlanga Padilla

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO
KM. 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. A.P. 133
TECOMÁN, COL. C.P. 28120
TEL. (313) 32 4 07 45
FAX (313) 32 4 27 73

Año 1999