

SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ESTADIOS L2 Y L3 DE *Phyllophaga elenans* A UNA CEPA NATIVA DE *Heterorhabditis* sp. EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Daniela Rodríguez*, Melissa Torres*, Lidieth Uribe^{1/}*, Lorena Flores^{**}

Palabras clave: *Heterorhabditis*, *Phyllophaga elenans*, nematodos entomopatógenos, control biológico, jobotos.
Keywords: *Heterorhabditis*, *Phyllophaga elenans*, entomopathogenic nematodes, biological control, white grubs.

Recibido: 19/03/09

Aceptado: 30/06/09

RESUMEN

Se evaluó el efecto de 6 cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP) sobre las larvas L2 de *Phyllophaga elenans*. La cepa que presentó los mejores resultados, *Heterorhabditis* sp. CIA-NE-07 fue evaluada a 125, 225, 375, 500 y 625 nematodos.larva⁻¹ para determinar su patogenicidad sobre larvas L2 y L3 de *P. elenans*. En el estadio L2 se observó que a los 7 días, todas las concentraciones, con excepción de la dosis 125 nematodos.larva⁻¹, causaron una mortalidad significativamente mayor que el testigo, en el cual no se presentaron muertes. A los días 14, 21 y 28 todos los tratamientos inoculados se diferenciaron significativamente del tratamiento control, observándose al día 30 una mortalidad del 68% con la dosis mayor utilizada. Se determinó que la dosis letal media correspondió a 475 nematodos.larva⁻¹. El tiempo letal medio fue de 7,5, 8,5 y 17,5 días para las concentraciones de 625, 500 y 225 nematodos.larva⁻¹, respectivamente. La inoculación con NEP no causó, en el estadio L3, diferencias significativas entre tratamientos al día 7, mientras que a los días 14, 21 y 28 las dosis de 500 y 625 nematodos.larva⁻¹ presentaron una mortalidad significativamente mayor que el control. La mortalidad mayor (24%), se obtuvo al día 30 con la dosis de 625 nematodos.larva⁻¹. La diferencia observada en los porcentajes de infección entre larvas L2 y L3 puede deberse a mecanismos de defensa o escape que podrían actuar en el estadio larval L3 de *P. elenans*.

ABSTRACT

Susceptibility of the developmental stages L2 and L3 of *Phyllophaga elenans* to a native strain of *Heterorhabditis* sp. at greenhouse. The effect of 6 native entomopathogenic nematodes (EPN) strains over the 2nd instar of *Phyllophaga elenans* was evaluated. The nematode strain with the best results, *Heterorhabditis* sp. CIA-NE-07, was evaluated at 125, 225, 375, 500 y 625 nematodes.larva⁻¹ to determine its pathogenicity over the 2nd and 3rd instar larvae of *P. elenans*. At the 7th day after inoculation, all doses except 125 nematodes.larvae⁻¹ caused a significantly mortality of the 2nd instar, in comparison to the control, in which no deaths occurred. At the 14th, 21st, and 28th day all the inoculated treatments were significantly different from the control; the highest dose caused 68% of mortality at day 30. It was determined that the median lethal doses corresponded to 475 nematode.larvae⁻¹ and the median lethal time was 7.5, 8.5 y 17.5 days for the 625, 500 and 225 nematodes.larvae⁻¹ concentrations, respectively. On day 7, EPN inoculation on third instar did not present significant differences among treatments; while at days 14, 21 and 28 only the 500 and 625 nematodes.larvae⁻¹ doses presented a significantly mortality than the control. The highest mortality (24%), was obtained at day 30 with the 625 nematode.larvae⁻¹ dose. The observed differences between second and third instars could be due to defense or escape mechanisms present in the 3rd instar of *P. elenans*.

1/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: lidieth.uribe@ucr.ac.cr

* Laboratorio de Microbiología Agrícola, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

** Laboratorio de Nematología, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Entre los organismos utilizados en el control biológico de plagas agrícolas, se encuentran los nematodos entomopatógenos (NEP), pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estos nematodos son parásitos obligados de insectos y establecen una simbiosis con bacterias de la familia Enterobacteriaceae presentes en su tracto intestinal. Así, Steinernematidae se asocia con bacterias del género *Xenorhabdus* y Heterorhabditidae con bacterias del género *Photorhabdus* (Kaya y Gaugler 1993, Goodrich-Blair y Clarke 2007).

Cuando el tercer estadio juvenil infectivo del nematodo (J13) encuentra un insecto susceptible, el nematodo invade y penetra al hospedero dirigiéndose hacia el hemocele del insecto a través de aberturas naturales (boca, espiráculos, ano), o por áreas delgadas de la cutícula (en el caso de los heterorhabditidos). Una vez en el hemocele, el J13 libera las bacterias simbiotas que matan al insecto hospedero en 48 horas por septicemia. Las bacterias producen antibióticos que evitan que otros microorganismos colonicen el cadáver, además de servir como fuente de alimento para el nematodo, la bacteria digiere los tejidos del hospedero proporcionando nutrientes adecuados para el crecimiento y desarrollo del nematodo. Los nematodos se reproducen dentro de la larva y los juveniles infectivos migran al suelo en busca de otros hospederos (Kaya y Gaugler 1993, Uribe-Lorío et al. 2005, Goodrich-Blair y Clarke 2007).

Los NEP constituyen una opción para el control de insectos plaga, ya que tienen un amplio rango de hospederos, capacidad de búsqueda hacia el hospedero, alta virulencia y pueden ser producidos comercialmente. Estos organismos pueden ser aplicados por métodos convencionales, son compatibles con plaguicidas químicos y biológicos, pueden persistir en el ambiente sin contaminarlo, no afectan plantas y vertebrados (Smart 1995, Kaya y Stock 1997, Koppenhöfer et al. 2002, Shapiro-Ilan y Gaugler 2002, Hazir et al. 2003, De Nardo y Parwinder 2003, Koppenhöfer y Fuzy 2008, Stock 2008).

Se ha realizado numerosas investigaciones respecto a su aplicación para el control de plagas de importancia económica (Smart 1995, Shapiro-Ilan y Gaugler 2002, Hazir et al. 2003, Georgis et al. 2006, McGraw y Koppenhöfer 2008), y varias especies de nematodos son utilizadas como insecticidas microbianos (Smart 1995, Shapiro-Ilan y Gaugler 2002, Georgis et al. 2006).

Un grupo de insectos plaga que podría ser controlado mediante la utilización de nematodos, son las larvas rizófagas de coleópteros (Coleoptera: Scarabaeidae) (Koppenhöfer et al. 2002, 2006, 2008, Koppenhöfer y Fuzy 2003, Ansari et al. 2006), conocidas como “gallina ciega” o “jobotos”.

En América tropical las especies más voraces y dañinas se encuentran dentro de los géneros *Anomala*, *Popillia*, *Macrodactylus*, *Cyclocephala*, *Strategus* y *Phyllophaga* (Morón et al. 1996). Este último, en Centroamérica se considera una plaga importante de varios cultivos (King 1984, Abarca et al. 1992, Abarca y Quesada 1997, Vargas y Abarca 1998, Oviedo et al. 1999). En Costa Rica se ha determinado que el tamaño poblacional de larvas de *Phyllophaga* spp. alcanza en algunas zonas hasta 20 larvas.m⁻² (Oviedo et al. 1999).

P. elenans es probablemente la especie más común y ampliamente distribuida en Costa Rica, y presenta un ciclo de vida de alrededor de 2 años, dependiendo de las condiciones ambientales (King 1984, Solís y Morón 1998, Oehlschlager et al. 2003). Para controlar esta plaga se utiliza la siembra de cultivos trampa alrededor de los campos infectados, la preparación del suelo, la adición de plaguicidas, así como la colocación de trampas de luz, trampas con feromonas y el uso de controladores biológicos como *Bacillus popilliae*, *Erwinia* sp., *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. (Chaves et al. 1999, Oehlschlager et al. 2003). Debido a que hay poca investigación sobre NEP para el control de *Phyllophaga* spp. (Quintero 2003, Koppenhöfer et al. 2004, Koppenhöfer et al. 2008), y específicamente respecto a *P. elenans*, se planteó este trabajo, que tuvo por objetivo evaluar la susceptibilidad de 2 estadios

larvales (L2 y L3) de *P. elenans* a la aplicación de diferentes concentraciones de una cepa nativa de nematodos entomopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas.

Cultivo in vivo de los nematodos

Multiplicación de larvas de *Tenebrio mollitor* y *Galleria mellonella*

Se establecieron pies de cría de los insectos *Galleria mellonella* y *Tenebrio mollitor*, que fueron utilizadas para el cultivo in vivo de los nematodos entomopatógenos. Larvas y adultos de *Galleria* fueron aportadas por el Dr. William Ramírez Benavides quién los obtuvo a partir de apiarios contaminados en Miramar de Puntarenas. Los tenebrios se adquirieron comercialmente. Ambos insectos se reprodujeron en condiciones de laboratorio, utilizando dietas a base de miel, germen de trigo, salvado de avena, harina integral, levadura y leche (*Galleria*) y a base de avena (*Tenebrio*).

Multiplicación de *P. elenans*

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron utilizando un pie de cría de *P. elenans* establecido en el laboratorio para prevenir el riesgo de contar con larvas de diferentes especies (Quintero 2003), así como para evitar la contaminación con microorganismos adquiridos en el campo (Vargas y Abarca 1998). Adultos de *P. elenans* (n=1191) recolectados en la Finca Achotal del Ingenio CATSA (Liberia, Guanacaste), se clasificaron por sexo y se distribuyeron en 4 grupos conteniendo cantidades similares de machos y hembras. Cada grupo se colocó en 1 recipiente que contenía suelo previamente autoclavado, en el que se dispuso además un frasco con agua y alimento (hojas de *Erythrina* sp.). El suelo de cada recipiente se revisó 2 veces por semana y los

huevos presentes fueron transferidos a recipientes plásticos de 400 cm³, conteniendo suelo autoclavado y 15 días después a bandejas plásticas con arroz germinado con el fin de que las larvas de primer estadio se alimentaran de las raíces de arroz. Una vez que las larvas alcanzaron el segundo estadio (L2), se trasladaron a vasos plásticos (una larva por vaso) conteniendo 120 g de suelo autoclavado, y en cada vaso se colocó una plántula de maíz como alimento. Cuando estas larvas alcanzaron su tercer estadio de desarrollo (L3) fueron mantenidas en los mismos vasos y cada larva se siguió alimentando con plántulas de maíz 2 veces por semana.

Aislamiento de las cepas de nematodos

El aislamiento de nematodos se realizó a partir de muestras de suelo provenientes de diferentes sistemas de producción en varias localidades del país (Cuadro 1). En cada sistema se tomaron 4 muestras compuestas de 5 submuestras recolectadas en forma de zig-zag a una profundidad de al menos 15 cm. Las muestras se recolectaron en bolsas de plástico de 2 kg y se transportaron al Laboratorio de Microbiología Agrícola.

Para la extracción de nematodos se empleó el método de Bedding y Akhurst (1975). Aproximadamente 700 cm³ de cada muestra de campo se colocó en un recipiente plástico de 900 cm³, sobre la superficie del suelo se colocaron 5 larvas de *T. mollitor* o *G. mellonella* como insectos trampa.

Los recipientes se taparon, se invirtieron y fueron incubados en la oscuridad durante 5 días a temperatura ambiente, al cabo de los cuales, se extrajo el suelo y se revisaron las larvas presentes en cada recipiente. Se eligieron los cadáveres que presentaron síntomas de infección por NEP, ausencia de descomposición, pudrición y fetidez (Rosa et al. 2000, Stock 2008). Los cadáveres que no presentaron estas características se eliminaron, aquellos con sospecha de infección por NEP, se colocaron en una trampa de White modificada por Kaya y Stock (1997). Las trampas se colocaron en la oscuridad y se revisaron diariamente

Cuadro 1. Aislamiento de cepas nativas de nemátodos entomopatógenos (NEP) en diferentes localidades y sistemas de producción.

Localidad	Coordenadas geográficas	Sistema de producción	Muestras positivas	Código de la cepa
Aserrí 1/Finca orgánica	9°46' 00"N 84°08'00" O	Café arbolado	1	CIA-NE-01
		Parche arbolado	1	CIA-NE-02
Aserrí 2/Convencional-Bajos insumos	9°46' 00"N 84°08' 05"O	Café arbolado	2	CIA-NE-03, CIA-NE-04
		Parche arbolado	0	-
Zarcero 1/ Finca orgánica	10°12' 5"N 84°24'02"O	Culantro	1	CIA-NE-05
		Parche arbolado	1	CIA-NE-06
Zarcero 2/Transición a orgánico	10°11' 5"N 84° 23' 05"O	Arracache	0	-
		Barbecho	0	-
		Cerca arbolada	1	CIA-NE-07
Pococí/Finca orgánica con una parcela convencional	10°14' 00"N 84° 44' 05"O	Yuca parcela orgánica	1	CIA-NE-08
		Yuca parcela convencional	1	CIA-NE-09
		Reserva	3	CIA-NE-10, CIA-NE-11, CIA-NE-12

hasta la emergencia de los nematodos, el agua que contenía los nematodos se almacenó a temperatura ambiente en frascos de cultivo celular a una densidad de 1000 a 2000 nematodos.ml⁻¹.

Multiplicación de los NEP

Para la realización de los ensayos de susceptibilidad, los nematodos se cultivaron en el último estadio de *G. mellonella* y los juveniles emergentes se cosecharon 10 a 14 días después. Los juveniles infectivos (JI3), empleados en los experimentos fueron almacenados a temperatura ambiente por no más de 15 días antes de su utilización.

Selección de cepas para los ensayos de susceptibilidad

Con el fin de seleccionar una cepa capaz de infectar *P. elenans*, se realizó una prueba preliminar en la que se determinó la capacidad de los aislamientos CIA-NE-02, CIA-NE-03, CIA-NE-07, CIA-NE-08, CIA-NE-09 y CIA-NE-12

(Cuadro 1), para infectar larvas de *P. elenans* en segundo estadio larval (L2). Cada larva se colocó individualmente en un vaso plástico que contenía 120 g de suelo previamente autoclavado a 121°C durante 1 hora, y se le agregó 5 ml de la dosis de 50 nematodos.ml⁻¹ (250 nematodos.larva⁻¹), 10 larvas (L2) se utilizaron por cada cepa, a cada larva del tratamiento testigo se adicionó 5 ml de agua destilada. Se realizaron revisiones diarias hasta el día 15 después de la inoculación. Las larvas muertas se colocaron en trampas de White, para determinar presencia de NEP. Se eligió la cepa que causó la muerte de la mayoría de las larvas inoculadas.

Efecto de 5 concentraciones de la cepa promisoría sobre larvas de segundo estadio (L2) y tercer estadio (L3) de *P. elenans*

Se evaluaron las concentraciones de 125, 225, 375, 500 y 625 nematodos.larva⁻¹, utilizando un diseño de bloques completos al azar. Cada tratamiento se replicó 5 veces y la unidad

experimental consistió en 5 larvas de *P. elenans* del segundo estadio (L2) o tercer estadio (L3), según correspondiese. Las larvas se colocaron en vasos plásticos con 120 g de suelo previamente autoclavado.

Cada vaso se inoculó con 5 ml de la suspensión de nematodos correspondiente a cada tratamiento. En el caso del testigo se adicionaron solamente 5 ml de agua destilada estéril. Los vasos colocados en bandejas plásticas se mantuvieron en bolsas de polietileno a temperatura ambiente. Las larvas se revisaron todos los días durante los 30 días del ensayo. Cada larva muerta se colocó en una trampa de White para corroborar la infección por NEP.

Se determinó el porcentaje de mortalidad, el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) para cada una de las concentraciones y mediante un análisis de regresión la Dosis Letal Media (DL₅₀) a los 8 días.

Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto de la aplicación de diferentes concentraciones del nematodo *Heterorhabditis* sp. sobre *P. elenans*, se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 5 repeticiones. La unidad experimental consistió de 5 larvas. El porcentaje de mortalidad obtenido a los 7, 14, 21 y a los 28 días se transformó mediante el arcoseno de la raíz cuadrada y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con los datos transformados para un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Para la separación de medias se utilizó LSD Fisher ($p \leq 0,05$). Se utilizó el paquete estadístico Infostat (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de las cepas de nematodos

Se extrajo NEP a partir de 9 de los 12 agroecosistemas estudiados (Cuadro 1) y en las 5 localidades evaluadas. Esta alta presencia de NEP puede deberse a que los sistemas muestreados son en su mayoría cultivos de manejo orgánico (Cuadro 1), o convencional con muy bajos insumos (sistema yuca convencional y sistema café

arbolado). En estos sistemas el aporte de insumos orgánicos producto de la actividad agrícola, aunado a la ausencia o poco uso de agroquímicos, puede favorecer la presencia de insectos hospederos y por ende la presencia de nematodos. Al respecto, Mráček et al. (1999) y, Mráček et al. (2005) indican que la presencia de nematodos podría estar influenciada por la abundancia de insectos hospederos adecuados.

Evaluación de diferentes cepas de nemátodos entomopatógenos

De las 6 cepas utilizadas (CIA-NE-02, CIA-NE-03, CIA-NE-07, CIA-NE-08, CIA-NE-09 y CIA-NE-12) únicamente 2 causaron, bajo las condiciones evaluadas, mortalidad en L2 de *P. elenans*, la cepa CIA-NE-07 aislada del sistema “cerca arbolada”, causó la muerte de 6 de las 10 larvas inoculadas, mientras que la cepa CIA-NE-09 provocó mortalidad solamente en 2 larvas. Todas las larvas estudiadas habían causado la muerte tanto de *Galleria* como de *Tenebrio* en condiciones de laboratorio. Al parecer los jobotos han desarrollado, producto de la co-evolución con microorganismos patógenos del suelo, una serie de conductas y de características morfológicas y fisiológicas que pueden impedir la infección por nematodos; así, factores como conducta evasiva de las larvas, poca emisión de CO₂, defecación frecuente, presencia de estructuras en los espiráculos, membrana peritrófica densa y fuerte sistema inmune, han sido señalados como factores que restringen la infección de los jobotos por nematodos (Koppenhöfer y Fuzy 2003, Koppenhöfer et al. 2004). Por otro lado, la interacción entre el nematodo y la bacteria con la larva ha sido también sugerida, factores como la capacidad de penetración del nematodo, la toxicidad y multiplicación de la bacteria, varían de un sistema nematodo-bacteria a otro (Ruisheng y Grewal 2007, Ansari et al. 2008).

La cepa CIA-NE-07 fue clasificada como *Heterorhabditis* sp. debido a la pigmentación roja que adquirieron los cadáveres de *P. elenans* (Figura 1), además por la presencia de un diente esclerotizado en la región anterior del cuerpo,



Fig. 1. Larvas de *Phyllophaga elenans* estadio L3 infectadas con la cepa *Heterorhabditis* sp. (CIA-NE-07). a. Larva sin aplicación de nematodos. b. Larva 24 h. después de inoculada con nematodos. c. Larva 48 h. después de inoculada con nematodos.

Efecto de 5 concentraciones de la cepa CIA-NE-07 sobre larvas L2 y L3 de *P. elenans*

La mayor mortalidad de larvas en el estadio L2 ocurrió durante la primera semana después de la inoculación, aumentando ligeramente hasta el día 22, después del cual, no ocurrió ninguna muerte. Al día 7, todas las dosis de nematodos con excepción de 125 nematodos.larva⁻¹ causaron una mortalidad significativamente mayor comparadas con el testigo, donde no se produjo ninguna muerte, en las evaluaciones realizadas a los 14, 21 y 28 días (Figura 2) todos los tratamientos fueron significativamente mayores que el control. Hacia el final del experimento, ocurrió un incremento de aproximadamente un 20% de mortalidad con respecto al día 7, así la mortalidad aumentó de un 20% a 40% en la dosis de 125 nematodos.larva⁻¹, de un 36% a un 60% en las dosis 225 y 375 nematodos.larva⁻¹ y de un 40% y 48% a un 68% en las dosis de 500 y 625 nematodos.larva⁻¹, respectivamente. En el caso del testigo no ocurrió mortalidad, lo que indica que las condiciones en las que se realizó el experimento

endotoquia matricida, bursa bien desarrollada en los machos, producción de hermafroditas en la primera generación y de machos y hembras en la siguiente generación, todas las características concuerdan con lo encontrado por otros autores para este género (Kaya y Stock 1997, Gómez et al. 2001, Nguyen y Hunt 2007, Stock 2008). La descripción del nematodo CIA-NE-07 será publicada independientemente. En Costa Rica se ha descrito únicamente la especie *Heterorhabditis indica*, que pertenece a este género (Uribe-Lorío et al. 2005).

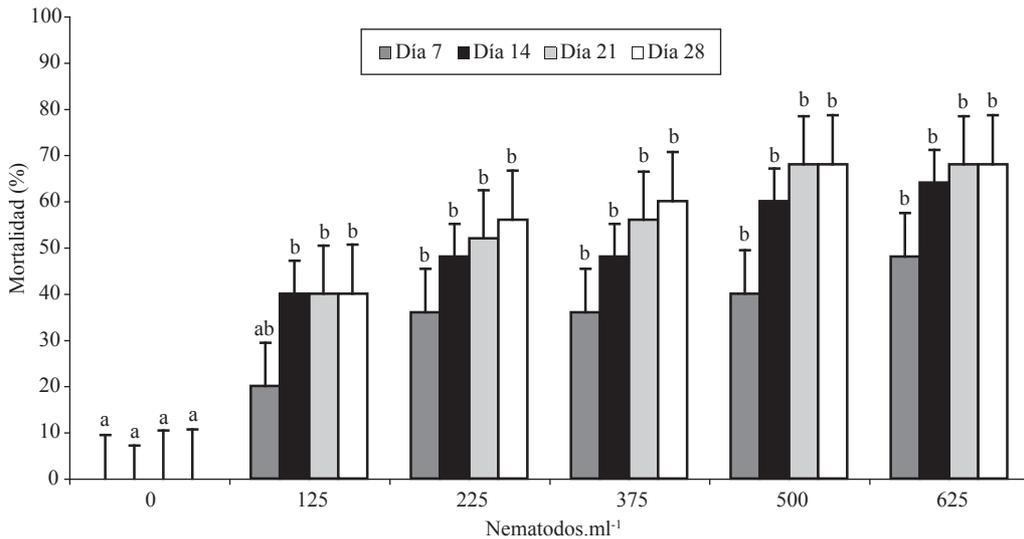


Fig. 2. Efecto de diferentes dosis de *Heterorhabditis* sp. CIA-NE-07 sobre larvas L2 de *P. elenans*. Barras con letras diferentes implican diferencias significativas según LSD $p < 0,05$.

fueron adecuadas para la sobrevivencia de las larvas. Según Georgis et al. (2006), un buen control para jobotos ocurre cuando se obtiene una mortalidad >70% empleando una tasa menor o igual a $2,5 \times 10^9$ JI.ha⁻¹, cantidad 10 veces mayor a la empleada en nuestro estudio.

Con respecto a la dosis letal media (DL₅₀) o dosis requerida para matar el 50% de las larvas de *P. elenans* a los 8 días, esta correspondió, de acuerdo a la ecuación de la curva de regresión, a 475 nematodos.larva⁻¹ (Figura 3). El resultado obtenido en este ensayo fue mayor que el reportado por Power et al. (2009) inoculando larvas de *Popillia japonica* con *H. bacteriophora*. Los autores encontraron una DL₅₀ que varió de 17 a 147 utilizando recipientes que contenían 1,5 g de suelo y de 127 empleando recipientes con 20 g de suelo. La menor DL₅₀ encontrada en ese estudio puede deberse a que las larvas se encontraban excesivamente confinadas en los recipientes utilizados (Power et al. 2009), a la mortalidad presente en dicho ensayo que varió del 5-10% en el tratamiento control y a una mayor susceptibilidad del género *Popillia* sp. En la literatura disponible hay pocas investigaciones en las que se reporte la DL₅₀ del estadio L2 ya que, como bien señalan Bhatnagar et al. (2004), comúnmente se utilizan en los experimentos 1 o 2 dosis de nematodos elegidas arbitrariamente.

Con respecto al tiempo letal medio (TL₅₀) o tiempo requerido para eliminar el 50% de la población de larvas de jobotos, se observó que a medida que se aumentó la dosis de nematodos utilizada, hubo una disminución en la TL₅₀. Así, para el nivel de 125 nematodos.larva⁻¹ no se logró eliminar el 50% de la población, mientras que para la dosis de 225 nematodos.larva⁻¹, el tiempo letal medio fue de 17,5 días, para la de 500 nematodos.larva⁻¹ fue de 8,5 días y para la de 625 nematodos.larva⁻¹ el TL₅₀ fue de 7,5 días. Los resultados de este ensayo indican que si bien no hubo diferencias significativas entre la mayoría de dosis de nematodos utilizadas, el tiempo en que se eliminó el 50% de la población varió sustancialmente con la dosis empleada, probablemente entre mayor sea la densidad de NEP

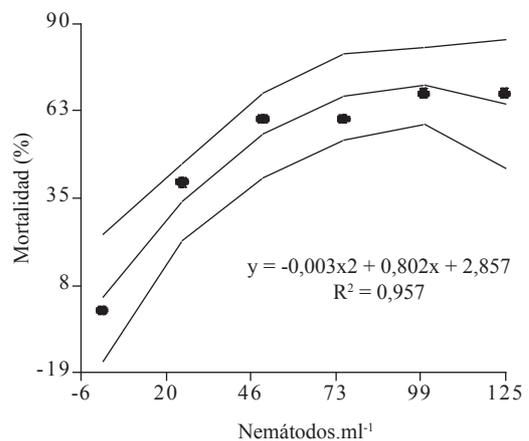


Fig. 3. Efecto de la concentración de *Heterorhabditis* sp. CIA-NE-07 sobre larvas L2 de *P. elenans* en condiciones de laboratorio 8 días después de la inoculación.

hay una mayor posibilidad de que el nematodo entre en contacto con la larva o sobrepase los mecanismos de defensa de esta. Debe estudiarse si el uso de dosis más altas que la evaluada (625 nematodos.larva⁻¹) causa una mayor mortalidad de la población de larvas L2 de *P. elenans* en un menor tiempo.

Cuando se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de la cepa CIA-NE-07 sobre las larvas L3 de *P. elenans* (Figura 4) se observó una mortalidad mucho menor que la obtenida con las larvas L2 (Figura 2). El porcentaje de mortalidad mayor alcanzado al día 7 fue de 16% para las dosis de 500 y 625 nematodos.larva⁻¹ (Figura 4), este valor no se diferenció significativamente de las otras dosis. En el día 14 después de la inoculación la mayor mortalidad se presentó en el tratamiento de 625 nematodos.larva⁻¹ (20%), que fue significativamente mayor que las dosis 0, 125 y 225 nematodos.larva⁻¹. A los 21 y 28 días se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de 500 y 625 nematodos.larva⁻¹ y las dosis 0, 125 y 225 nematodos.larva⁻¹ (Figura 4). A diferencia del estadio L2, en el estadio L3 el incremento en mortalidad desde el día 7 al día 30 fue bajo, únicamente la dosis más alta presentó un

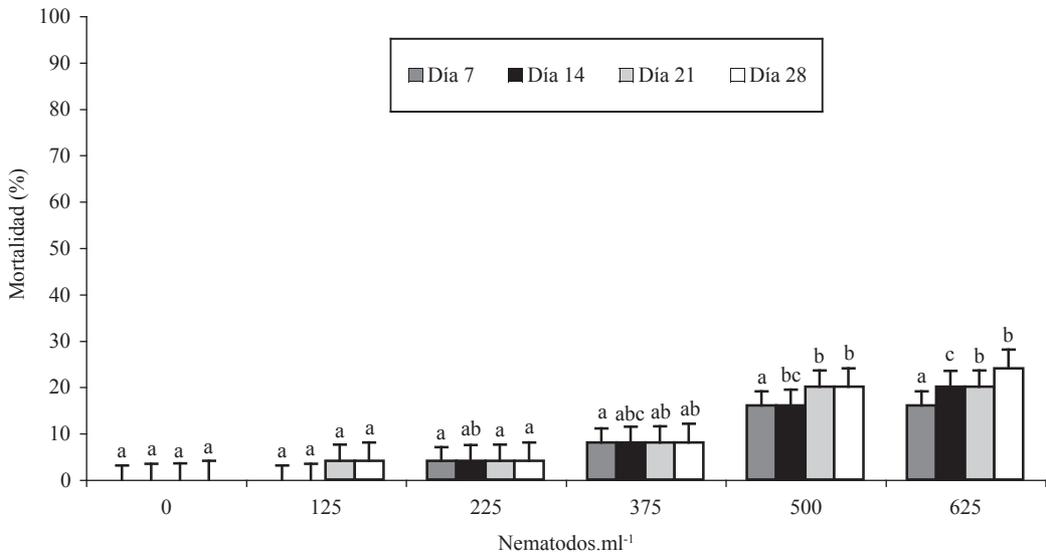


Fig. 4. Efecto de diferentes dosis de *Heterorhabditis* sp. CIA-NE-07 sobre larvas L2 de *P. elenans*. Barras con letras diferentes implican diferencias significativas según LSD $p < 0,05$.

incremento de aproximadamente un 12% (casi el doble de lo obtenido al día 7).

En el presente estudio no se logró para las larvas L3, aún con la dosis más alta (625 nematodos.larva⁻¹), obtener el 50% de mortalidad. En investigaciones realizadas con larvas de tercer estadio de 12 especies de jobotos (entre ellas 3 especies de *Phyllophaga*), Koppenhöfer et al. (2004) encontraron una gran variación en la respuesta de las larvas a los NEP, específicamente *P. crinita* y *P. congrua* presentaron una susceptibilidad menor o igual al 14% a *H. bacteriophora*, mientras que en *P. georgiana* la susceptibilidad fue de 46%. Quintero (2003) encontró que el porcentaje de mortalidad ocasionado por *Heterorhabditis* sp. sobre *Phyllophaga menetriesi* fue también bajo, con 31,6 y 21,0%. Koppenhöfer et al. (2008) dedujeron, a partir de estudios con *Phyllophaga georgiana*, que se requerían tasas de 5×10^9 .ha⁻¹ de *H. zealandica* y *H. bacteriophora* para lograr un control aceptable en este estadio larval. Esta tasa es 10 veces mayor que la empleada en nuestro estudio.

Existe gran variación en el efecto de los NEP sobre larvas del tercer instar de diferentes especies de jobotos; Grewal et al. (2002) encontraron que *H. zealandica* fue significativamente más virulenta hacia *P. japonica* que *H. bacteriophora*, y *H. megidis*, con una DL₅₀ de 272 JI.larva⁻¹, mientras que para los otros nematodos la DL₅₀ fue mayor de 500. A su vez, los valores de DL₅₀ para *A. orientalis* y *C. borealis* empleando las mismas cepas variaron entre 211 y 860 JI.larva⁻¹. Valores de DL₅₀ de 49 a 785 (Power et al. 2009) y de 140 a 253 para *P. japonica* (Koppenhöfer et al. 2006), de 280 a 730 para *A. orientalis*, 198 a 437 en *C. borealis* (Koppenhöfer et al. 2006), y de 621 para *Rhizotrogus majalis* para *H. zealandica* han sido reportados. Al igual que en nuestro ensayo, para *R. majalis* no se pudo determinar la DL₅₀, debido a la baja susceptibilidad de la larva a las 2 cepas de *H. bacteriophora* evaluadas. Por su parte Bhatnagar et al. (2004) reportaron, utilizando *H. bacteriophora* una DL₅₀ de 14.090 juveniles infectivos sobre larvas del tercer estadio de *Maladera insanabilis*.

Existen diferencias en el efecto de los NEP sobre larvas de jobotos de estadios distintos. En esta investigación, las larvas L2 de *P. elenans* fueron más susceptibles que las larvas L3 a *Heterorhabditis* sp., estos resultados coinciden con lo reportado por Lee et al. (2002) en su trabajo con larvas de *A. orientalis* inoculadas con *Heterorhabditis* sp., quienes encontraron que el nematodo causó el 100% de mortalidad del segundo estadio de *A. orientalis* y únicamente el 38% del tercer estadio. Koppenhöfer y Fuzzy (2004) observaron que la susceptibilidad de *A. orientalis* a *H. bacteriophora* decreció del primero al segundo y tercer estadio. Además, Grewal et al. (2004) indicaron que el primero o segundo estadio de *P. japonica*, en condiciones de laboratorio, fue menos susceptible que el tercer a los NEP. Power et al. (2009) en ensayos de laboratorio y de campo utilizando esta misma plaga encontraron resultados similares con *H. bacteriophora*. Contrariamente, Ansari et al. (2008) encontraron que *H. bacteriophora* y *H. indica* fueron más virulentos al tercer estadio que al segundo de *H. philanthus*. Por otro lado, no se observó diferencias en el efecto del nematodo *H. bacteriophora* sobre distintos estadios de la larva *P. japonica* (Koppenhöfer y Fuzzy 2004) y de los nematodos *H. zealandica* y *H. bacteriophora* sobre la larva *Phyllophaga georgiana* (Koppenhöfer et al. 2008).

De acuerdo a la literatura, las larvas L3 pueden ser menos susceptibles a los nematodos debido a los siguientes factores: un sistema inmune que ha desarrollado la capacidad de eliminar patógenos invasores, conducta evasiva y agresiva de las larvas L3 que puede reducir el contacto con los JI desfavoreciendo el ataque de los NEP, la presencia de una cutícula más gruesa, alta tasa de defecación que disminuye la infección vía anal, la formación de celdas en el suelo antes de pupar que puede reducir el contacto con los NEP (Gaugler et al. 1994, Koppenhöfer y Fuzy 2003, Ansari et al. 2006, Power et al. 2009), así como una reducción en la alimentación cuando la larva llega al estado de prepupa, disminuyendo la posibilidad de penetración bucal de los nematodos,

comportamiento documentado por Koppenhöfer et al. (2004) para *A. orientalis* y *P. japonica* utilizando los nematodos *S. scarabaei* y *H. bacteriophora*. Sin embargo, esos mecanismos de defensa solo han sido descritos en algunas especies de escarabajos y es probable que su presencia y grado de expresión varíe considerablemente entre especies de coleópteros (Koppenhöfer y Fuzy 2003) y como señala Ansari et al. (2008) la virulencia podría estar relacionada con la interacción entre el nematodo y la bacteria con la larva, más que a una característica general específica como tamaño del cuerpo o aberturas naturales.

A la fecha no se puede hacer generalizaciones sobre el efecto de los nematodos en el ciclo de vida del insecto y en la susceptibilidad de diferentes insectos (Koppenhöfer et al. 2006, Ansari et al. 2006, Grewal et al. 2002, Ansari et al. 2008) ya que los mecanismos de interacción larva-nematodo-bacteria varían de un estadio a otro y de una especie a otra. En el caso de *Phyllophaga* se debe realizar estudios para dilucidar los mecanismos de acción que hacen al estadio L2 más susceptible que L3 y si este comportamiento ocurre para las diferentes especies de *Phyllophaga* y de nematodos entomopatógenos.

El conocimiento del efecto de los NEP sobre los diferentes estadios del insecto tiene implicaciones prácticas, ya que permitiría realizar las aplicaciones en el momento adecuado. En el caso de *P. elenans* controlar el joboto antes del tercer estadio no solo limita el ataque a las raíces de las plantas, sino que el estadio L2 al ser más susceptible, es más propenso a un control efectivo y como señalan Koppenhöfer et al. (2006) y Power et al. (2009) la progenie de los NEP que emergió del cadáver puede reciclarse en el campo causando una mortalidad mayor. Estos resultados deben corroborarse en estudios a nivel de campo.

CONCLUSIONES

Debido a la gran variabilidad en la interacción nematodo hospedero, es importante determinar no solo la susceptibilidad de larvas de

diferentes especies al nematodo estudiado, si no conocer cuál estadio larval es más susceptible al efecto de estos.

Para el control de *P. elenans* utilizando la cepa CIA-NE-07 de *Heterorhabditis* sp., las aplicaciones deben hacerse en forma temprana, cuando hayan larvas susceptibles (L1 o L2) en el campo, esto permitiría no solo afectar el estadio susceptible si no que los nematodos podrían reciclarse y causar infecciones secundarias en otros estadios como el L3.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Jesús Vargas Acosta (CATSA), al Tec. Med. Daniel Alfaro Solís (Programa Entomología-LAICA-DIECA) y al Ing. Alejandro Rodríguez Morales (CORBANA) por el aporte de adultos de *P. elenans* para realizar la investigación, así como al Dr. William Ramírez Benavides por el aporte de larvas de *Galleria*. Este trabajo se financió con fondos de los proyectos VI 733-A1-821 y VI 733-A6-132 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

LITERATURA CITADA

- ABARCA G., QUESADA M. 1997. Especies del complejo de jobotos (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.), asociadas a cultivos, en el Valle Central y Pacífico Seco de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 8:44-53.
- ABARCA G., VARGAS E., MATA R. 1992. Alternativas de combate del complejo de larvas de jobotos (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. *Cyclocephala* spp.) (Col.: Scarabaeidae) en fresa (*Fragaria ananassa*). *Agronomía Costarricense* 16 (1):45-54.
- ANSARI M.A., ALI F., MOENS M. 2006. Compared virulence of the Belgian isolate of *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and the type population of *S. scarabaei* to white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Nematology* 30:787-791.
- ANSARI M.A., ADHIKARI B.N., ALI F., MOENS M. 2008. Susceptibility of *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Biological Control* 47:315-321.
- BEDDING R., AKHURST R. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil. *Nematologica* 21:109-110.
- BHATNAGAR A., SHINDE V., BARETH S.S. 2004. Evaluation of entomopathogenic nematodes against white grub, *Maladera insanabilis* Brenske. *International Journal of Pest Management* 50:285-289.
- CHAVES M., RODRÍGUEZ A., SALAZAR J.D., SÁENZ C. 1999. Plagas y fitosanidad de la caña de azúcar en Costa Rica. In: *Memorias XI Congreso Nacional Agronómico/V Congreso Nacional de Entomología*. Costa Rica. p 129.
- DE NARDO E.A.B., PARWINDER S.G. 2003. Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. *Biocontrol Science and Technology* 13:441-448.
- GAUGLER R., WANG Y., CAMPBELL J. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: Defenses against entomopathogenic nematode attack. *Journal of Invertebrate Pathology* 6:193-199.
- GEORGIS R., KOPPENHÖFER A.M., LACEY L.A., BÉLAIR G., DUNCAN L.W., GREWAL P.S., SAMISH M., TAN L., TORR P., VAN TOL R.W.H.M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control* 38:103-123.
- GOMEZ L., SOLER D.M., SANCHEZ L. 2001. Virulencia y potencial reproductivo de aislamientos cubanos de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 16:50-54.
- GOODRICH-BLAIR H., CLARKE D.J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology* 64:260-268.
- GREWAL P.S., GREWAL S.K., MALIK V.S., KLEIN M.G. 2002. Differences in susceptibility of introduced and native white grub species to entomopathogenic nematodes from various geographic localities. *Biological Control* 24:230-237.
- GREWAL P.S., POWER K.T., GREWAL S.K., SUGGARS A. HAUPRICHT S. 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with new strains of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 30:73-82.

- HAZIR S., KAYA H.K., STOCK S.P., KESKIN N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. Review. Turkish Journal of Biology 27:181-202.
- INFOSTAT 2001. Estadística y biometría. Versión 1.0. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- KAYA H.K., GAUGLER R. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38:181-206.
- KAYA H.K., STOCK S.P. 1997. Techniques in insect nematology. pp.281-324. In: L. A. Lacey (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic.
- KING A.B.S. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in Central America. Tropical Pest Management 30:36-50.
- KOPPENHÖFER A.M., COWLES R.S., COWLES E.A., FUZY E.M., BAUMGARTNER L. 2002. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. Biological Control 24:90-97.
- KOPPENHÖFER A.M., FUZY E.M. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. Biological Control 28:47-59.
- KOPPENHÖFER A.M., FUZY E.M. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. Journal of economic entomology 97:1842-1849.
- KOPPENHÖFER A.M., FUZY E.M. 2008. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). Biological control 45:93-102.
- KOPPENHÖFER A.M., FUZY E.M., CROCKER R.L., GELERNTER W.D., POLAVARAPU S. 2004. Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against 12 white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). Biocontrol Science and Technology 14:87-92.
- KOPPENHÖFER 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 38:397-404.
- KOPPENHÖFER A.M., RODRIGUEZ-SAONA C.R., POLAVARAPU S., HOLDCRAFT R.J. 2008. Entomopathogenic nematodes for control of *Phyllophaga georgiana* (Coleoptera: Scarabaeidae) in cranberries. Biocontrol Science and Technology 18:21-31.
- LEE D.W., CHOO H.Y., KAYA H.K., LEE S.M., SMITLEY D.R., SHIN H.K., PARK C.G. 2002. Laboratory and field evaluation of Korean entomopathogenic nematode isolates against the Oriental Beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology 95:918-926.
- MC GRAW B.A., KOPPENHÖFER A.M. 2008. Evaluation of two endemic and five commercial entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) against annual bluegrass weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. Biological Control 46:467-475.
- MRÁČEK Z., BEČVĚR S., KINDLMANN P. 1999. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditia) in the Czech Republic. Folia Parasitologica 46:145-148.
- MRÁČEK Z., BEČVĚR S., KINDLMANN P., JERSÁKOVÁ J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. Biological Control 34:27-37.
- MORÓN M., HERNÁNDEZ S., RAMÍREZ Y.A. 1996. El complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) asociado con la caña de azúcar en Nayarit, México. Folia Entomológica Mexicana 98:1-44.
- NGUYEN K.B., HUNT D.J. 2007. Heterorhabditidae: species descriptions. pp. 611-692. In: K. Nguyen y D.J. Hunt (eds). Nematology monographs and perspectives Vol 5. Entomopathogenic nematodes: Systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Brill.
- OEHLSCHLAGER A.C., LEAL W.S., GONZALEZ L., CHACON M., ANDRADE R. 2003. Trapping of *Phyllophaga elenans* with a female-produced pheromone. Journal of Chemical Ecology 29:27-36.
- OVIDO M., BOLAÑOS J., RODRÍGUEZ A., SÁENZ C. 1999. Determinación de la población de jobotos (*Phyllophaga* spp.) en la región de Pérez Zeledón. In: Memorias XI Congreso

- Nacional Agronómico/V Congreso Nacional de Entomología. Costa Rica p. 139.
- POWER K.T., RUISENG A., GREWAL P.S. 2009. Effectiveness of *Heterorhabditis bacteriophora* strain GPS11 applications targeted against different instars of the Japanese beetle *Popillia japonica*. *Biological Control* 48:232-236.
- QUINTERO M.P. 2003. Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis de licenciatura, Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia. 49 p.
- ROSA J.S., BONFASSI E., AMARAL J., LACEY L.A., SIMOES N., LAUMOND C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. *Journal of Nematology* 32:215-222.
- RUISENG A., GREWAL P.S. 2007. Differences in the virulence of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema scarabaei* to three white grub species: The relative contribution of the nematodes and their symbiotic bacteria. *Biological Control* 43:310-316.
- SHAPIRO-ILAN D.I., GAUGLER R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28:137-146.
- SMART G.C. 1995. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology* (Supp.) 27(4S):529-534.
- SOLÍS A., MORÓN M. 1998. Distribución, diversidad e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en Costa Rica (Coleoptera: Melolonthidae), pp. 19-28. In: M.A. Morón y A. Aragón (eds). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. Publicación especial de la Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de entomología, A.C. Puebla, México.
- STOCK S.P. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de los nematodos parásitos de insectos. In: S.P. Stock, L. Uribe, L. Uribe-Lorío (eds). Curso Teórico-Práctico. Aplicaciones biotecnológicas de los nemátodos parásitos de insectos. CIA-CIBCM-CIPROC-CONICIT-CRUSA-UNU-BIOLAC. 87 p.
- URIBE-LORÍO L., MORAM., STOCK S.P. 2005. First record of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica. *Journal of Invertebrate Pathology* 88:226-231.
- VARGAS E., ABARCA G. 1998. Relación entre el estrés y las bacterias entomopatógenas *Pantoea* (*Erwinia*) *agglomerans* (*herbicola*) y *Bacillus cereus* en jobotos (Col: Melolonthidae) (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.), en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 9:25-30.