

Artículo Científico

Patogenicidad y multiplicación de aislados de nemátodos entomopatógenos para el control de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae)

Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic nematode isolates for the control of *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae)

Leonara Evangelista Figueiroa¹, Roseane Cristina Predes Trindade¹, Juan Pablo Molina Acevedo², Aldomario Santo Negrisoli Junior², Erasmo Ribeiro Paz Filho¹, Elmadã Pereira Gonzaga¹ y David Jossue López Espinosa¹

¹ Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Centro de Ciências agrarias de Alagoas - CECA BR-104 Norte km 85 S/N - Rio Largo CEP: 57100-000. AL. E-mail: leonara100@gmail.com

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA Tabuleiro Costeiros - BR-104 Norte km 85 S/N - Rio Largo CEP: 57100-000. AL.

ZooBank: urn:lsid:zoobank.org:pub:B473FCB2-0611-443E-97D0-85B6F0689C15

Resumen. La relevancia de las hortalizas en el sector económico es reconocida por su importancia social, generando empleos e ingresos en la agricultura familiar. El cultivo de brasicáceas o crucíferas es uno de los más demandados en el mundo, siendo la palomilla *Plutella xylostella* (Linnaeus) su principal plaga, debido a su fácil dispersión, corto ciclo de vida y gran capacidad de desarrollar resistencia a los insecticidas. Por tal motivo, la adopción de métodos de control alternativo son importantes para la elaboración de un plan de manejo integrado de plagas, orientado a una producción sustentable. Por lo cual, es necesario que sean desarrolladas técnicas seguras de control de plagas responsables de efectos limitantes en la producción hortícola. Otra estrategia potencial en el control de plagas, mediante el control microbiano, son los nemátodos entomopatógenos, que no dejan residuos químicos en los cultivos y no contaminan el medio ambiente. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la patogenicidad y multiplicación de aislados de nemátodos entomopatógenos para el control de *P. xylostella*. Utilizando técnicas de inoculación, fueron realizados dos experimentos en el tercer y cuarto instar de la plaga. Los nemátodos presentaron un ciclo de vida corto y alta capacidad de virulencia sobre la plaga, representando una alternativa eficiente para el control microbiano de la palomilla.

Palabras claves: Brásicas, crucíferas, microlepidóptero, control microbiano, palomilla.

Abstract. The relevance of vegetables in the economic sector is recognized for its social importance, generating jobs and income in family farming. The cultivation of Brassicaceae or cruciferous is one of the most demanded in the world, being the *Plutella xylostella* (Linnaeus) its main pest, due to its easy dispersion, short life cycle and great capacity to develop resistance to insecticides. For this reason, the adoption of alternative control methods are important for the development of an integrated pest management plan, oriented towards sustainable production. Therefore, it is necessary to develop safe pest control techniques responsible for limiting effects on horticultural production. These are the entomopathogenic nematodes, which do not leave chemical residues in the crops and do not pollute

Recibido 12 Octubre 2018 / Aceptado 31 Diciembre 2018 / Publicado online 31 Enero 2019

Editor Responsable: José Mondaca E.

the environment. Thus, the objective of this work was to evaluate the pathogenicity and multiplication of entomopathogenic nematode isolates for the control of *P. xylostella*. Using inoculation techniques, two experiments were performed in the third and fourth instar of the pest. The nematodes showed a short life cycle and high virulence capacity on the pest, representing an efficient alternative for the microbial control of the moth.

Key words: Brassic, cruciferous, microlepidóptero, microbial control, moth.

Introducción

La palomilla *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), es considerada una de las principales plagas de los cultivos pertenecientes a la familia Brassicaceae en todo el mundo. Este insecto es un microlepidóptero que posee un ciclo de vida corto, gran capacidad de dispersión y resistencia a insecticidas (Ulmer *et al.* 2002). Por tal motivo, la adopción de métodos de control alternativo son importante para la elaboración de un plan de manejo integrado de plagas. El uso de insecticidas sintéticos, generalmente es la forma más utilizada para el control, con aplicaciones de cantidades excesivas de producto en épocas inadecuadas, generando cada vez más individuos resistentes a los plaguicidas (Furlong *et al.* 2013).

La tendencia del manejo de plagas en la actualidad, es buscar cada vez más alternativas que no sean perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente, orientadas al control y manejo de importantes cultivos como las brásicas o crucíferas como el repollo, coliflor, brócoli, entre otros (Saiti y Luchini 1998). El control biológico es una herramienta potencial en la agricultura sostenible, más eficiente y menos nociva para la sociedad (Parra *et al.* 2002). Una de las estrategias de control micribiano explorada para esta plaga es el uso de bacterias entomopatógenas como *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *Xenorhabdus nematophila*, aislada de nemátodos entomopatógenos, bacterias que han demostrado tener alta virulencia en *P. xylostella*, presentándose como una alternativa biológica para el control de la palomilla (Nangong *et al.* 2016). Otra estrategia de control microbiano que ha sido explorada en los últimos años han sido los nemátodos entomopatógenos o entomonemátodos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae para el control de *P. xylostella* (Zolfagharian *et al.* 2016).

Los nemátodos entomopatógenos sirven como hospedantes de bacterias patógenas simbióticas, asociación mutualística que determina patogenicidad y virulencia en insectos plaga. Estos organismos viven en el suelo, penetran en el insecto a través de aberturas naturales, y una vez ocurrida la penetración, las bacterias entomopatógenas son liberadas en el interior del insecto lo que provoca disturbios en su sistema inmunológico y posteriormente provoca la muerte del insecto huésped (Ferraz 1998). Investigaciones como la presente son fundamentales pues están orientadas a profundizar en el conocimiento de áreas poco estudiadas, como uso de agentes de control microbiano, como los entomonemátodos, contemplados dentro de potenciales estrategias de manejo de la palomilla.

El objetivo de esta investigación fue verificar la patogenicidad y la multiplicación de aislados nativos de nemátodos entomopatógenos en la palomilla *P. xylostella*.

Materiales y Métodos

Bioensayos de patogenicidad, sintomatología, virulencia y reproducción de jóvenes infectantes (JIs).

En los bioensayos fueron utilizados aislados de NEPs como: *S. carpocapsae* Santa Rosa Strain, *H. amazonensis* cepas JPM4, RSC 03, *S. feltidae* UK Strain, *Heterorhabditis* spp. P5,

S. brasiliense y *H. bacteriophora*. La infección con cada aislado utilizado fue hecha por un sistema tópico, aplicando una concentración de JIs (Jóvenes Infectantes) sobre 8 larvas de *P. xylostella*, en placas Petri con papel filtro Whatman®, humedecido con 1 ml de agua destilada (ADE), según la metodología propuesta por Woodring y Kaya (1988). Fueron utilizadas diez repeticiones por el sistema de infección por aislado.

En el testigo fue aplicado 1 ml ADE sin NEPs en placas para cultivo de células (Petri) con una larva de *P. xylostella* por placa, las mismas fueron cerradas con film plástico y colocadas en una incubadora con oscuridad total a 25 ± 2 °C. Después de las 72 horas de inoculación, fue evaluado el porcentaje de mortalidad (PM), la cual fue estimada en relación al número de larvas de *P. xylostella* muertas y el número total de larvas utilizadas (vivas y muertas).

$$PM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas muertas}}{\text{N}^\circ \text{ total de larvas vivas y muertas}} \times 100$$

Después de la obtención de porcentajes en la mortalidad, para cada aislado de nemátodos y para el testigo, fue estimado el porcentaje de mortalidad corregida (PMC) para los tratamientos, mediante la fórmula de Abbott (Alves *et al.* 1998).

$$PMC = \frac{\text{PM del tratamiento} - \text{PM del testigo}}{100 - \text{PM del testigo}} \times 100$$

Después de transcurridas 72 horas de infección, las larvas muertas fueron introducidas en una cámara de incubación para registrar la producción acumulada de JIs de diferentes aislados en las larvas de *P. xylostella*. La sintomatología fue observada después de las 120 horas de infección, a través de la coloración o la descomposición de los cadáveres del insecto.

Resultados y Discusión

Bioensayos de patogenicidad y multiplicación de NEPs sobre el control de *P. xylostella*.

Los resultados demostraron que todos los nemátodos entomopatógenos utilizados como tratamiento en los bioensayos, poseen virulencia sobre *P. xylostella*. Con larvas de tercer ínstar, conforme a lo descrito en las tablas 1, 2, y 3; seguido de otros bioensayos con larvas de cuarto ínstar descritos en las tablas 4, 5 y 6. Las evaluaciones mostraron resultados diferentes, en el experimento utilizando el tercer ínstar, reflejó una mortalidad mayor donde los nemátodos mostraron una considerable virulencia sobre las larvas con casi 100% en la mayoría de las muestras (Tabla 1).

De acuerdo con los resultados, se observó que todos los tratamientos fueron extremadamente virulentos sobre la plaga en su tercer ínstar. Además de esa abrumante representación de virulencia, la plaga en cuestión, resultó ser un efectivo hospedante para los nemátodos (ver Tabla 2).

Las larvas del orden Lepidoptera son conocidas como un excelente sustrato para la multiplicación de nemátodos, ya que poseen un sistema inmunológico deficiente, comparado con otros órdenes de insectos (Cherry *et al.* 2004). Ya para *P. xylostella*, Alencar (2012), evaluando la virulencia del aislado de *Heterorhabditis amazonenses*, *H. indica*, *Steinernema brasiliense* y *S. feltiae* aplicado sobre la plaga, en concentraciones de 200 JI/insecto, constató que todos los aislados de nemátodos entomopatógenos fueron virulentos, causando la muerte de *P. xylostella*. Así mismo, en estudios realizados por Schroer y Ehlers (2005), con aplicaciones foliares de *Steinernema carpocapsae* fueron patogénicos en larvas de *P. xylostella*. Trabajos más recientes de Zolfagharian *et al.* (2016), fue observado una alta mortalidad de larvas de *P. xylostella* (72,6-96%) por las especies *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* en experimentos de laboratorio. En el caso del experimento realizado se encontró un mayor efecto patogénico de entomonemátodos, con mortalidades de 100% en larvas de *P. xylostella*

por especies nativas brasileras como *S. carpocapse* Santa Rosa Strain, *H. amazonensis* JPM4, *Heterorhabditis* spp. P5 y *H. amazonensis* RSC 03 y la especie exótica *S. feltiae* UK strain (tabla 1).

De la misma forma que *S. brasiliense* y *H. bacteriophora* presentaron un efecto patogénico importante en larvas de *P. xylostella* con mortalidades de 87,5 y 66,6% respectivamente (Tabla 1).

La sintomatología fue verificada a través de la presencia de nemátodos en los cadáveres de las larvas, donde fue posible observar el ciclo de desarrollo dentro del hospedante, confirmando ciclos cortos debido a la correlación con el tamaño pequeño de la larva (Tabla 2). Con relación al segundo experimento, en larvas de cuarto instar, los resultados fueron similares al primer experimento, como el ciclo corto de NEPs y de la considerable capacidad de *P. xylostella* como organismo útil para la multiplicación del agente entomopatógeno

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad corregida en larvas de *Plutella xylostella* en el tercer ínstar infectadas con diferentes nemátodos entomopatógenos.

| Especies | % PMC |
|--|-------|
| T2. <i>S. carpocapse</i> Santa Rosa Strain | 100 |
| T3. <i>H. amazonensis</i> JPM4 | 100 |
| T4. <i>S. feltiae</i> UK Strain | 100 |
| T5. <i>Heterorhabditis</i> spp. P5 | 100 |
| T6. <i>H. amazonensis</i> RSC 03 | 100 |
| T7. <i>S. brasiliense</i> | 87,5 |
| T8. <i>H. bacteriophora</i> | 66,6 |

Tabla 2. Sintomatología y ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos.

| Especies | <i>S. carpocapse</i> (T2) | JPM4 (T3) | <i>S. feltiae</i> (T4) | P5 (T5) | RSC 03 (T6) | <i>S. brasiliense</i> (T7) | <i>H. bacteriophora</i> (T8) |
|----------------------------------|------------------------------|--------------|---------------------------|------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Sintomatología para la infección | 50% 06/10-09/10 | 40% | 60% | 50% | 70% | 80% | 90% |
| Clase del ciclo de vida | C | C | C | C | C | C | C |

Tabla 3. Ensayo de patogenicidad de los nemátodos entomopatógenos sobre el cuarto ínstar de *Plutella xylostella*.

| Especies | Porcentaje de mortalidad corregida % |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| T2. <i>S. carpocapse</i> | 11,11 |
| T3. <i>H. amazonensis</i> JPM4 | 20,00 |
| T4. <i>S. feltiae</i> | 33,33 |
| T5. <i>Heterorhabditis</i> spp. P5 | 33,33 |
| T6. <i>H. amazonensis</i> RSC 03. | 33,33 |
| T7. <i>S. brasiliense</i> | 50,0 |
| T8. <i>H. bacteriophora</i> | 33,33 |

(Tabla 3). También fue posible observar una menor y tardía mortalidad del cuarto ínstar. Considerando la biología, se determinó que las larvas alcanzaron el estado de pupa, pero no emergieron adultos, ósea, se produjo un quiebre del ciclo biológico en el que el insecto no logra transmutar, provocándole la muerte (Tabla 4). Comparando estos experimentos, se observó que la mortalidad en el tercer ínstar fue mayor. Ya para el segundo experimento ocurrió una menor mortalidad, además del quiebre en su ciclo biológico.

De esta forma queda en evidencia que los nemátodos entomopatógenos poseen una gran capacidad para el control de plagas en brásicas y que también son capaces de multiplicarse dentro de su hospedante, interrumpiendo el ciclo vital del insecto.

Tabla 4. Sintomatología y ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos.

| Especies | <i>S. carpocapse</i> (T2) | JPM4 (T3) | <i>S. feltiae</i> (T4) | P5 (T5) | RSC 03 (T6) | <i>S. brasiliense</i> (T7) | <i>H. bacteriophora</i> (T8) |
|----------------------------------|------------------------------|--------------|---------------------------|------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Sintomatología para la infección | 80% 01/11-06/11 | 70% | 80% | 80% | 70% | 90% | 50% |
| Clase de ciclo de vida | C | C | C | C | C | C | C |

Conclusión

Los aislados nativos de nemátodos entomopatógenos *S. carpocapse* Santa Rosa Strain, *H. amazonensis* JPM4, RSC03, *Heterorhabditis* spp. P5, *S. brasiliense* y las cepas exóticas *S. feltiae* y *H. bacteriophora* presentaron patogenicidad, multiplicándose eficazmente en larvas de tercer y cuarto ínstar de *P. xylostella*, demostrando una alta mortalidad sobre la plaga. Por lo anterior, las especies nativas evaluadas, adaptadas a las condiciones del trópico, son ideales para ser exploradas para el control de la palomilla en crucíferas como estrategia asociada en un programa de manejo integrado de la plaga.

Agradecimientos

A la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria-EMBRAPA unidad Tabuleiros Costeiros por proporcionar la infraestructura necesaria para el desarrollo de esta investigación.

Literatura Citada

- Alencar, J.R. De C.C. de (2012)** *Plutella xylostella*: variabilidade populacional e suscetibilidade a *Beauveria bassiana* e a nematoides entomopatogênicos. 2012. iv, 89 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2012. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/11449/91319>>.
- Alves, S.B., Almeida, J.E.M., Moino, Jr A. y Alves, L.F.A. (1998)** Técnicas de laboratório, p. 637-711. In: Alves, S.B. (ed). Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 pp.
- Cherry, A.J., Mercadier, G., Meikle, W., Castelobranco, M. y Schroer, S. (2004)** The role of entomopathogens in DBM biological control. pp. 51-70. In: Kirk, A. A; Bordat, D. (Eds.). Improving biocontrol of *Plutella xylostella* proceedings of the international symposium, Montpellier, France, 21-24 October 2004. CIRAD.

- Ferraz, L.C.C.B. (1998)** Nematoides entomopatogênicos. *In*: Alves, S.B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, p. 541-569.
- Furlong, M.J., Wright, D.J. y Dosdall, L.M. (2013)** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annual Reviews Entomology*, 58: 517-541.
- Zolfagharian, M., Saeedizadeh, A. y Abbasipour, H. (2016)** Efficacy of two entomopathogenic nematode species as potential biocontrol agents against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Biological Control*, 30(2): 78-83.
- Nangong, Z., Wang, Q., Song, P., Hao, J., Yang, Q. y Wang, L. (2016)** Synergism between *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus nematophila* against resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biocontrol Science and Technology*, 26(10): 1411-1419.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrê-Ferreira, B.S. y Bento, J.M.S. (2002)** Controle biológico: terminologia, p. 1-16. *In*: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S. y Bento, J.M.S. (eds.) Controle biológico no Brasil – parasitoides e predadores. Piracicaba, Ed. Manole, 609 pp.
- Saito, M.L. y Lucchini, F. (1998)** Substancias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficiente e seguro ao meio ambiente. Jaguriúna; EMBRAPACNPMA. 46 p. (EMBRAPA-CNPMA. Série Documentos, 12).
- Schroer, S. y Ehlers, R.-U. (2005)** Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological control*, 33(1): 81-86.
- Ulmer, B., Gillott, C., Woods, D. y Erlandson, M. (2002)** Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. *Crop Protection*, 21: 327-331.