

# CICLO DE VIDA DEL ENTOMONEMATODO NATIVO

## *Steinernema feltiae* Filipjev

### Life cycle of native entomonematode *Steinernema feltiae* Filipjev

Adriana Sáenz<sup>1</sup> y Jesús Emilio Luque<sup>2</sup>

#### RESUMEN

En el laboratorio de Control Biológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, sede Bogotá, se estudio la biología básica del entomonematodo nativo *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae). Utilizando larvas de último instar de la polilla mayor de las colmenas *Galleria mellonella*, expuestas a 8000 juveniles infectivos/caja de petri y realizando disecciones diariamente, se determinaron los estados de desarrollo, duración del ciclo vida y relación de sexos del nemátodo nativo. El ciclo de vida consiste de un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto (macho y hembra); éste se inicia con el estado de vida libre o juvenil infectivo (J3) y puede tener dos vías. Si los nutrientes son suficientes y la densidad de J3 inicial es baja, estos desarrollan los machos y hembras de la primera generación. Los huevos de estas hembras adultas eclosionan y los juveniles se desarrollan hasta formar hembras y machos adultos de la segunda generación. Los huevos producidos por estas hembras dan origen a los J3. Este ciclo corresponde al ciclo de vida largo, que toma 10 días a 20°C. Si los nutrientes son insuficientes, los J3 desarrollan hembras y machos adultos de la primera generación y los huevos producidos por las hembras desarrollan el estado juvenil infectivo. Este ciclo corresponde al ciclo de vida corto, que toma seis días a 20°C. Los nemátodos son tolerantes a temperaturas de 10 a 24°C. La relación de sexos de la primera generación está influida por la temperatura. Las hembras a 15°C constituyen el 62% de la población, pero a 30°C corresponden al 43%.

**Palabras claves:** Juveniles infectivos, primera generación, segunda generación, adultos, *Galleria mellonella*.

#### SUMMARY

The basic biology of the native entomonematode *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) was studied at the Laboratory of Biological Control which belongs to Agronomy Faculty of the National University of Colombia. Larvae of last instar of the greater moth of *Galleria mellonella*, were exposed to 8000 infective / box. Dissections were done daily and developmental stages, life cycle and ratio sexes were determined for native nematode. The life cycle consisted of six stages: egg term, four juvenile periods and one adult stage. The last one period began at infective juvenile 3 (J3). This one could be in two ways: If there is

enough food and the initial density is low, the male and female are developed. Eggs from female of first generation will develop males and females for second generation. The J3 generation will be produced from female of second cycle. The last one correspond to the long time cycle (10 days / 20°C). If nutrients are low, J3 cycle develop female and males of the first generation. Eggs for this cycle will be develop infective juvenile stage. This one will be the short life (6 days / 20°C). Nematodes are tolerant to temperatures between 10 to 24°C. Temperature about 15°C will show 62% of female, while 30°C will correspond to the 43% of female.

**Key words:** Infectives Juveniles, first generation, second generation, adults, *Galleria mellonella*.

#### INTRODUCCION

Las especies que pertenecen al género *Steinernema* Travassos, 1927 (= *Neoaplectana* Steiner, 1929) son patógenos obligados de insectos. Presentan características que les son únicas, ya que, a diferencia de otros Rhabditida, han desarrollado la habilidad de presentar una asociación mutualista con bacterias específicas del género *Xenorhabdus* (Akhurst, 1993), las cuales facilitan la muerte del hospedero y éxito en la reproducción de los nemátodos, además de resistir las defensas del hospedero y evitan ser reconocidos por el sistema de respuesta del insecto. Sin embargo, el destino de la bacteria en el hemocele varía con la especie de insecto y el estado fisiológico del mismo (Dunphy y Thurston, 1990). También, tienen gran capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a condiciones adversas (Molyneux, 1985), presentan un amplio rango de hospedantes (Poinar, 1979); la capacidad de actuar en forma sinérgica con otros entomopatógenos incrementan su eficacia y resaltan su potencialidad como biorreguladores de poblaciones de insectos perjudiciales (Koppenhofer y Kaya, 1997); pueden ser cultivados *in vivo* e *in vitro* (Bedding, 1981-1984) y los estados infectivos pueden ser almacenados por largos periodos, conservando su capacidad infectiva y, posteriormente, ser aplicados a través de los métodos convencionales empleados para insecticidas químicos (Friedman, 1990).

El ciclo de vida de las especies del género *Steinernema*, descrito por Glaser (1932), Bovien (1937), Dutky (1974) y Poinar (1979), consiste de un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto (macho y hembra). El segundo estado juvenil (J2) puede ser el estado preinfectivo o el estado no preinfectivo y el tercer estado juvenil puede ser el estado infectivo (J3) o el estado

<sup>1</sup> Bióloga. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. E-mail: adrinemato@yupimail.com /adsaenz@poligran.edu.co

<sup>2</sup> Profesor Asistente. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. E-mail: jluquez@usa.net

no infectivo (IJ). Generalmente ocurren dos generaciones en un insecto hospedero. Kaya y Stock (1997) establecen que algunos de los huevos producidos por la primera generación de hembras desarrollan J3, pero la mayoría de los huevos dan origen a la segunda generación de adultos. Los huevos producidos por la segunda generación de hembras se desarrollan en J3, los cuales conservan la cutícula del segundo estado juvenil, que les confiere resistencia a condiciones ambientales adversas (Stock, 1998). Wouts (1980) establece que la presencia de los estados juveniles está condicionada por la densidad de J3 que ingresan inicialmente a un hospedero.

En Colombia, aunque no se han realizado estudios relacionados con la biología básica de entomonemátodos nativos, se pueden destacar los trabajos de Caicedo y Bellotti (1996), Ortiz (1994) y Garzón *et al.* (1996), con especies que pertenecen al género *Steinernema*, para el control de algunas plagas de interés nacional. Por ello, esta investigación reporta el ciclo de vida del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae*, además de la descripción de los estados juveniles, influencia de la temperatura en el ciclo de vida y la relación de sexos.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Control Biológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, de Bogotá, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

### Material Entomológico

Se utilizó como insecto hospedero larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas en laboratorio con dieta artificial (Garzón y Aza, 1994). Esta dieta está compuesta por: harina de maíz (400 gr), germen de trigo (160 gr), levadura de cerveza (100gr), leche en polvo (50gr), miel de abejas (160ml), glicerina (125ml), agua (100ml) y formaldehído (0,03%, ml). Los ingredientes sólidos y líquidos se prepararon por separado y luego se mezclaron hasta conseguir una pasta homogénea que se colocó dentro de una bolsa plástica y se aplanó con un rodillo hasta obtener un grosor de 0,5 cm. Se cortaron círculos de dieta del mismo diámetro de la base de los frascos de cría (bomboneras) y se colocaron dentro de éstos, junto con dos tiras que contenían huevos, los frascos se taparon herméticamente y se colocaron en cámaras de cría a una temperatura de 22°C.

### Obtención del entomonemátodo nativo

Los 24.000 juveniles infectivos de *S. feltiae*, que se utilizaron para los diferentes ensayos, se obtuvieron de las existencias de almacenamiento del laboratorio de control biológico de la Facultad de Agronomía; los cuales se encontraban almacenados a 10°C, en recipientes de 20ml, que contenían 2ml de agua destilada y 30 (1 de Triton x100 (Sáenz, 1998).

### Ciclo de vida del entomonemátodo nativo

Estudios preliminares con *Steinernemátodos* (Wouts, 1980) indican que cuando el suministro de nutrientes es limitado y hay superpoblación; los entomonemátodos tienen un ciclo de vida corto (una generación) y, cuando hay gran cantidad de nutrientes, un ciclo normal o largo (2 generaciones). Para con-

firmar la presencia de los ciclos, se realizaron los siguientes montajes:

**A. Ciclo de vida largo.** Se expusieron 50 larvas de *G. mellonella* por 10 días a 8000 J3, en cajas de petri (100x15 mm) a 20°C con papel filtro humedecido y se disectaron diariamente hasta cuando el ciclo de los entomonemátodos se completó. Las larvas se disectaron en cajas de petri de 60x15 mm cada 6 y 12 horas. El proceso de infección y disección se replicó 10 veces para confirmar la presencia de cada estado de vida. Además, mediante las disecciones, se hicieron observaciones sobre sitios de invasión, características de cada estado de desarrollo y cambios morfológicos durante el ciclo.

**B. Ciclo de vida corto.** Pedazos pequeños de tejido de la larva (1mm<sup>3</sup>) se colocaron en un pedazo de papel filtro saturado de agua (1cm<sup>2</sup>) en una caja de petri de 60X15mm. Dos hembras preadultas y dos machos adultos del entomonemátodo, procedentes desde cualquiera de las larvas, se transfirieron al tejido, además, se adicionaron cuatro gotas de agua cerca al papel para asegurar la humedad, se sellaron y mantuvieron a 20°C. Este procedimiento se replicó 20 veces, las cajas se examinaron diariamente hasta cumplidos siete días y se contaron los nemátodos obtenidos.

### Descripción de los estados del ciclo de vida del entomonemátodo nativo *S. feltiae*

La descripción morfológica de cada estado se realizó con montaje en placa (Stock, 1998). Los datos morfométricos de longitud total y ancho del cuerpo de cada estado se tomaron con ayuda del ocular micrométrico del microscopio CARL-ZEISS y los oculares 20 y 40X, respectivamente.

### Influencia de la temperatura en el ciclo de vida

Para establecer la influencia de la temperatura en el ciclo de vida, se expusieron 50 larvas de *G. mellonella* por caja de petri (100x15 mm) a 8000 J3, para un total de 16 cajas. Grupos de dos cajas se colocaron a temperaturas de 10; 15; 20; 24; 30; 33; 35 y 37°C. Después de dos días, se disectaron diariamente tres larvas y los estados de vida se determinaron hasta completar el ciclo de vida.

### Influencia de la temperatura en la relación de sexos de la primera generación de adultos

Para determinar la influencia de la temperatura en el rango de sexos hembras/machos, se expusieron 10 larvas de *G. mellonella* a 8000 J3 en cajas de petri (tres en total). Cada caja de petri se colocó a 15, 24 y 30°C. Después de tres días, todas las larvas se disectaron y el número de hembras y machos se contabilizó. Las pruebas estadísticas consistieron de una prueba de Ji-Cuadrado y rango múltiple de Duncan, usando el programa SPSS.

## RESULTADOS

### Ciclo de vida largo de *Steinernema feltiae*

Mediante las disecciones de las larvas inoculadas, se pudo comprobar que el juvenil infectivo o J3 de vida libre aplicado a larvas de último instar de *G. mellonella* invade a través de la boca, ano y espiráculos penetra la pared del sistema digestivo y entra a la cavidad corporal. Algunos J3 se acumulan en la cápsula cefálica y

parte posterior del intestino. El J3, antes de mudar al próximo estado juvenil, inicia su desarrollo incrementando la longitud total del cuerpo y del estoma y después que alcanza la cavidad corporal del hospedero; esto toma en promedio ocho horas (Figura 1).

El ciclo de vida de *S. feltiae* está compuesto de ciclo largo (dos generaciones) y ciclo corto (una generación), pero esto depende del número de J3 que, inicialmente invade el hospedero y la disponibilidad de nutrientes para los estados de desarrollo, lo cual se observa en el montaje de larvas y trozos de tejido. Este entomonemátodo nativo presenta siete estados diferentes de desarrollo: huevo, cuatro estados juveniles (J1, J2, J3 y J4), separados por mudas y adultos de los dos sexos (machos y hembras). Los cuatro estados juveniles son morfológicamente distintos.

Dieciséis horas después de haber ingresado al hospedero, el estoma del juvenil infectivo se abre gradualmente, el esfago incluyendo el bulbo basal, se expande y las glándulas excretoras incrementan su tamaño. La cámara bacteriana, ubicada en la región anterior del intestino, contiene las células bacterianas de *Xenorhabdus bovienii* que son liberadas, a través del ano, en el hemocele de las larvas de *G. mellonella*. En la hemolinfa, las bacterias se propagan y causan septicemia, la cual, en 48 horas, mata las larvas de la polilla mayor de las colmenas, *G. mellonella*. Alcanzada la cavidad corporal del hospedero, este juvenil crece muy poco en longitud pero dobla su ancho. A las 24 horas, mudan a J4 o preadultos machos y hembras (esto se inicia con el rompimiento de la cutícula posteriormente y el nemátodo empieza a salir, abandonando la cutícula vieja. (Figura 2). El ancho del cuerpo de los J4 se incrementa más rápido que en longitud, hasta alcanzar casi el ancho

y la longitud del adulto. Durante este tiempo, el ducto excretor llega a ser largo y se ha formado el sistema reproductor.

El J4 muda formando la primera generación de hembras y machos jóvenes entre las 48 y 60 horas después de la inoculación. Inicialmente, ambos sexos son de igual tamaño, pero las hembras incrementan varias veces su longitud, mientras que los machos lo hacen a lo ancho. El apareamiento se inicia en el momento que uno o dos machos están cerca de una hembra y uno de ellos se enrolla a ella e inserta la espícula por la vagina o, en algunas veces, en zonas diferentes del cuerpo de la hembra hasta encontrar la vulva y, finalmente, realizar la cópula. Al finalizar la copula, el macho se desenrolla de la hembra y ésta puede ser copulada por otro macho. La mayoría de las hembras expulsan los huevos; sin embargo algunas hembras desarrolladas tardíamente retienen en su cuerpo los huevos (ovovivíparas) y éstos embargo, algunas hembras desarrolladas tardíamente eclosionan internamente, iniciándose el proceso de nutrición de los J1 (Figura 3). De 12 a 20 horas después, los J1 rompen el cuerpo de la hembra y se mueven entre el hemocele del insecto. Los J1 mudan a J2 y estos mudan a J3 (juvenil infectivo), que retiene la cutícula del segundo estado juvenil, la cual le sirve como protección (Figura 4). Otros J1 sufren mudas sucesivas a J2, J3 y J4 y aparece la segunda generación de adultos hembras y machos. Sin embargo, esto se ve condicionado por la disponibilidad de nutrientes y la densidad de la progenie de la primera generación, es decir, en un hospedero fresco y con una densidad poblacional baja, se desarrolla rápidamente el J4. Cuando la densidad de la población es alta y los nutrientes son insuficientes, se desarrollan los J2 dando origen a los J3 infectivos. Las

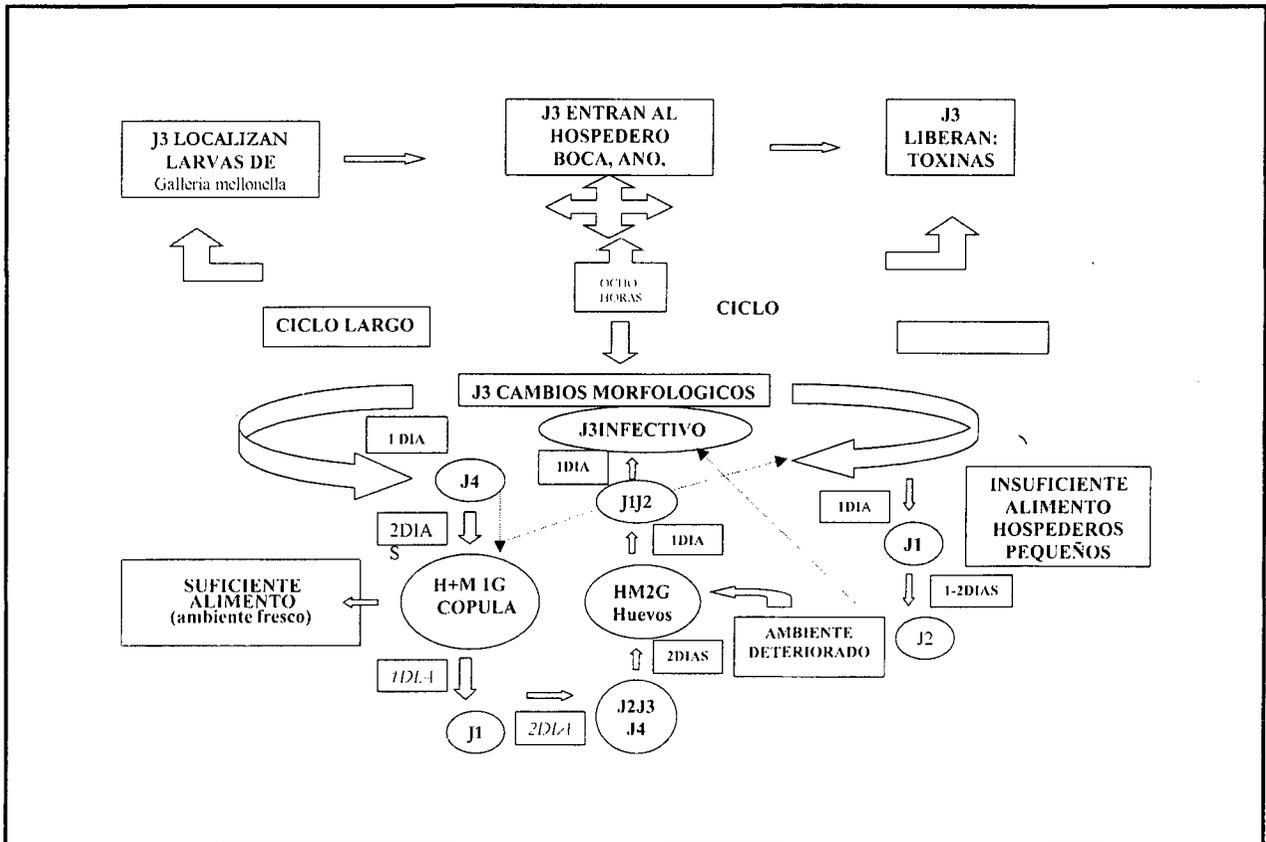


Figura 1. Ciclos de vida largo y corto del nemátodo nativo *Steineria feltiae*. H: hembra, M: macho, 1G: primera generación, 2G: segunda generación

hembras se alimentan y viven cerca de cuatro a cinco días y los machos viven de seis a siete días.

Los adultos de la segunda generación aparecen entre las 120 a 130 horas y son mucho más pequeños que los adultos de la primera generación. El ciclo de vida largo de *Steinernema feltiae* tiene una duración de 10 días, en el cual se completan las dos generaciones (Figura 1).

#### Ciclo de vida corto de *Steinernema feltiae*

En cuanto al ciclo corto, se pudo establecer que los J3 aparecen al quinto día después de colocadas las hembras preadultas y los machos adultos en el tejido de la larva, muchos J3 están presentes después de 6 días (Figura 1). Además, cerca del 99% son J3 infectivos (30 cajas de las 40 replicas y todos los J3 son juveniles infectivos) y el 1% son J3 no infectivos (las 10 cajas restantes, con un 99% de J3 infectivos). Los J3 producidos por el ciclo corto son igualmente infectivos a larvas de *G. mellonella*, como son los obtenidos por ciclo largo. La tasa reproductiva promedio de la primera generación de hembras de *S. feltiae* fue de 1537,78 J3 ( $n=40$ ; rango: 312-3680 J3).

#### Descripción de los estados del ciclo de vida del entomonemátodo nativo *S. feltiae*

**Primer estado juvenil (J1):** El J1 emerge desde el huevo y son transparentes y activos y, después de alimentarse, acumulan reservas y toman una apariencia oscura (Figura 5). La cutícula es lisa, amfidos y fasmidos no observados, región labial ligeramente cerrada y con seis labios. Estoma triangular, ceilostoma cambia de transparente en jóvenes a parcialmente oscuro en J1 próximos a mudar a J2. Prostoma-telestoma en forma de embudo; esófago, isthmus y bulbo basal distintivo. Poro excretor presente e inconspicuo. Ano distintivo. Cola cónica y con terminación aguda, los J1 mudan a J2 aproximadamente 13 horas después de salir del huevo. Los J1

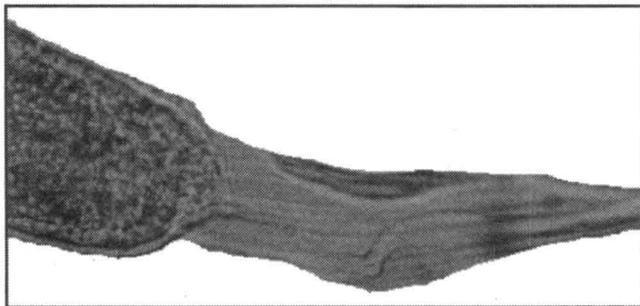


Figura 2. Tercer Estado juvenil no Infectivo de la Primera Generación en proceso de muda.

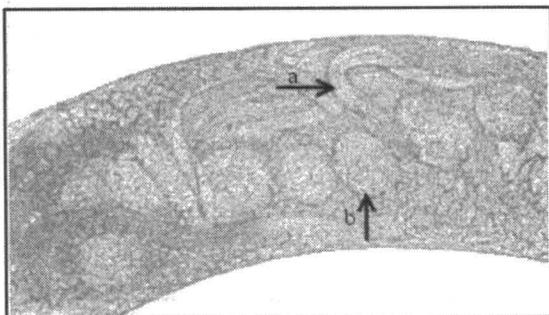


Figura 3. Hembra de primera generación del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae*. a: primer estado juvenil (J1) en el útero; b: huevos.

disectados desde larvas de *G. mellonella* y colocados en agua mueren sin completar su desarrollo. El rango de longitud va desde 225 $\mu$ m a 250 $\mu$ m y el ancho desde 17,5 $\mu$ m a 27,5 $\mu$ m ( $n=10$ ).

**Segundo estado juvenil (J2):** Cutícula lisa, campos laterales ausentes, fasmidos no se distinguen fácilmente. Región labial con seis labios. Ceilostoma cerrado, protostoma-telostoma y esófago presentes, isthmus distintivo, rodeado por el anillo nervioso, poro excretor indistinto. Intestino oscuro y con reservas. Ano distintivo, con labio posterior extendido. Cola gradualmente aguda y delgada al terminar (Figura 6). La oscilación de la longitud es desde 450 $\mu$ m a 580 $\mu$ m y el ancho, desde 42,5 $\mu$ m a 57,5 $\mu$ m ( $n=10$ ). Si los J2 se desarrollan bajo condiciones desfavorables (Figura 1), éstos pueden ser considerablemente pequeños o, si el alimento es suficiente, el J2 se desarrolla a J3. Sin embargo, si el alimento es insuficiente (hospederos pequeños, por ejemplo, *Achroia grisella* y *Tecia solanivora*, Sáenz (1998)) o si los J2 son removidos desde una fuente de alimento, después de 14 horas el estoma se estrecha, el esófago se reduce en tamaño y los J2 llegan a ser J2 preinfectivos, justamente antes de mudar al tercer estado infectivo, los cuales retienen la cutícula del segundo estado, la cual le sirve

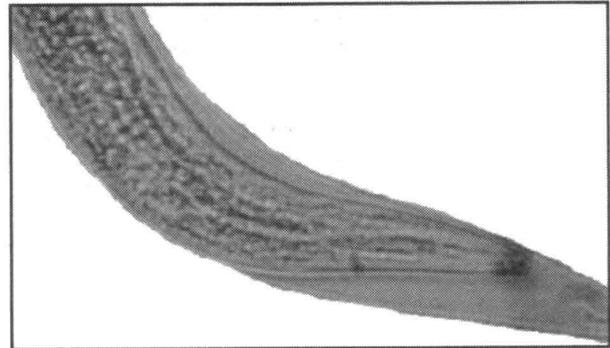


Figura 4. Juvenil Infectivo del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae*. a. Cutícula del segundo estado juvenil.

como protección. Los J2 disectados desde larvas infectadas en 0,1ml de agua y los fluidos del cuerpo, llegan a ser juveniles infectivos entre 24 y 36 horas.

**Tercer estado juvenil no infectivo (ij) de la segunda generación:** El tamaño del cuerpo es variable, pero es más grande que el J2 de la segunda generación. El lumen intestinal es prominente. Los IJ mudan a J4 aproximadamente a las 24 horas. El rango de longitud del cuerpo es de 740 $\mu$ m a 900 $\mu$ m y el ancho, de 38 $\mu$ m a 57 $\mu$ m ( $n=10$ ).

**Tercer estado juvenil infectivo (J3):** Cuerpo delgado, agudo desde la base del esófago al extremo posterior. Cutícula con anulación transversa distintiva, claramente visible en desarrollos tempranos, cuando todavía está rodeado por la cutícula del J2 y hasta finales del desarrollo, cuando reanuda el crecimiento en un nuevo hospedero (Figura 4). Campos laterales con nueve líneas laterales. Región labial lisa, generalmente no cerrada. Protostoma-telostoma en forma triangular anteriormente. Esófago largo y estrecho, con lumen ocupando de 1/3 a 1/4 del ancho del cuerpo, angosto a nivel del anillo nervioso, terminando en el bulbo. Poro excretor distintivo, localizado a nivel de la mitad del esófago. Ducto excretor largo, glándula excretora ventral y desplaza el bulbo basal y el extremo anterior del intestino. Una bolsa bacteriana encerrada por la pared intestinal e inmediatamente debajo del Cardia. Lumen del intestino angosto o cerrado. Pared intestinal oscura y con glóbulos. Recto

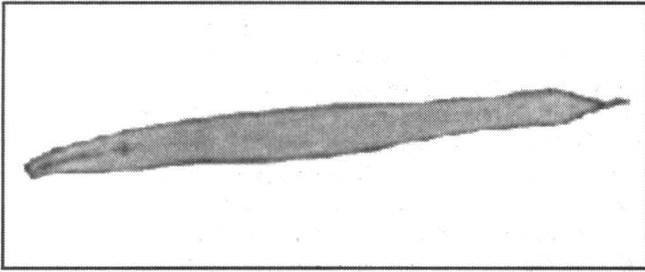


Figura 5. Primer Estado Juvenil (J1) del entonemátodo nativo *Steinernema feltiae*.

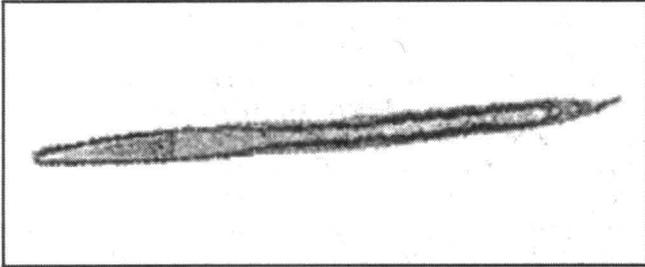


Figura 6. Segundo Estado Juvenil (J2) del entonemátodo nativo *Steinernema feltiae*.

largo y angosto, ano distintivo. Cola cónica con terminación aguda. El rango de longitud del cuerpo es de 680µm a 900µm y el ancho, de 24µm a 34µm.

**Cuarto estado juvenil (j4) preadulto macho y hembra de la primera y segunda generación:** Cutícula lisa, líneas laterales ausentes. Anfidos indistintos, ceilostoma triangular. Prostomatelostoma esclerotizado y en forma de embudo. Esófago ancho, ocupa cerca de la mitad del ancho del cuerpo, procorpus hinchado, realizando el ithmus angosto, lumen trirradiado. Anillo nervioso inmediatamente anterior al bulbo basal. Bulbo Basal piriforme. Poro excretor a nivel de la mitad del esófago, abierto, glándulas excretoras grandes, desplazando el bulbo basal dorsalmente. Lumen del intestino ancho. Desarrollo del tracto genital. En los J4 hembras, se observan los primordios conspicuos de la vulva y, en el J4 macho, los primordios de las espículas. Recto ancho, ano distintivo con labios anales posteriores (Figura 7). Cola considerablemente corta más que en el J3. Excepto por los primordios de los órganos sexuales y la forma de la cola, no hay caracteres que distingan J4 machos y hembras. Además, las dos generaciones son similares y varían únicamente en el tamaño. Este estado dura aproximadamente de 12 a 24 horas. El estado adulto del macho, puede ser reconocido por las espículas bien formadas, gubernaculum, gónadas y mucrón en la cola del adulto (Figura 8). La longitud del cuerpo de la primera generación de J4 hembras va de 2282.4µm a 2853µm y el ancho, desde 120µm a 200µm (n=10); en el J4 machos desde 951µm a 1014.4µm y ancho, desde 70µm a 80µm (n=10). La longitud de la segunda generación de J4 hembras, desde 951µm a 1046µm y ancho, desde 90µm a 105µm (n=10); J4 machos, desde 900µm a 950µm y ancho, desde 27,5µm a 52,5µm (n=10).

**Macho de la primera generación:** Cutícula lisa, sin líneas laterales; región labial, estoma y esófago como en el preadulto, excepto por las glándulas excretoras que están localizadas bajo el bulbo basal y no están desplazadas. Poro excretor distintivo, muy abierto, localizado a nivel del procorpus. Testículos reflexos. Espículas

duras, amarillas y con manubrio grande (Figura 9). *Gubernaculum* amarillo, distalmente angosto, extremo proximal, usualmente, inclinado anteriormente y es, aproximadamente, la mitad máxima del

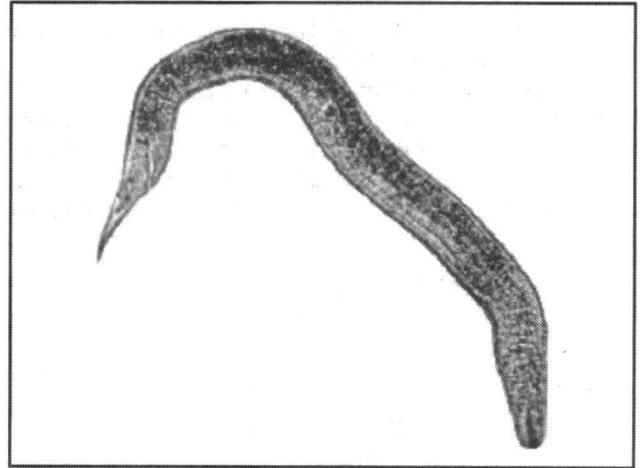


Figura 7. Cuarto estado Juvenil (J4) preadulto macho y hembra de la primera generación del entonemátodo nativo.

ancho. Cola aguda, delgada y terminación corporal en un fino mucrón. Bursa ausente (Figura 8). La longitud va desde 1085µm a 1430µm y el ancho, desde 82µm a 98 (n=10).

**Macho de la segunda generación:** estos machos son similares a los de la primera generación, excepto que ellos son cortos (780µm a 995µm) y, aproximadamente, la mitad de ancho (45µm a 58µm).

**Hembra de la primera generación:** Cutícula lisa, líneas laterales ausentes. Región labial, inicialmente, parecida a la del preadulto. En hembras grandes, la papila labial se incrementa en tamaño, la región labial y el estoma se ensanchan. Anfidos oscuros. Ceilostoma con paredes esclerotizadas. Prostoma-telostoma a forma de embudo. Esófago corto con relación al tamaño del cuerpo, similar al J4. Bulbo basal piriforme y pequeño, en comparación a otros estadios y con relación al tamaño del cuerpo. Poro excretor a nivel del procorpus. Glándulas excretoras desplazadas a la parte anterior del intestino. Tracto genital pareados y reflexos. Utero y espermateca localizados ventralmente; ovarios localizados dorsalmente y terminan ventralmente enfrente de la mitad del cuerpo. Labios vulvares sobresalientes. Recto y ano distinti-

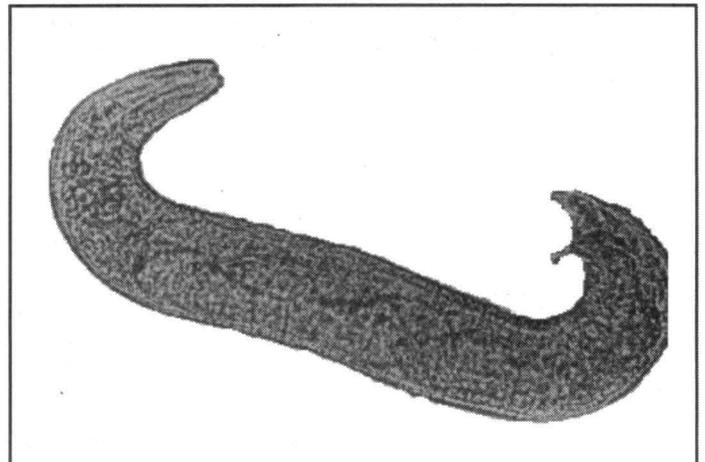


Figura 8. Macho de primera Generación del entonemátodo nativo *Steinernema feltiae*.

vos. Labio anal posterior, cola ligeramente delgada, cuerpo redondeado al final, con terminación mucronada. La longitud corporal va desde 2658µm a 5175µm y el ancho, desde 140µm a 220µm (n=10).

**Hembra de la segunda generación:** Estas hembras son similares a las de la primera generación, excepto que son más pequeñas: 1.800µm a 2.500µm de largo y 80µm a 119µm de ancho.

**Influencia de la temperatura en el ciclo de vida:** La temperatura influyó en el ciclo de vida de *S. feltiae*. A 10°C, la primera generación de hembras y machos aparece a los doce días de expuesto el hospedero (Cuadro 1). Los J1 de esta generación se encuentran a los 15 días, embebidos en el tejido graso y su movimiento es muy lento. A los 18 días, el tamaño de algunos J1

rollan la primera generación de adultos. La mayoría de estos adultos están en la parte anterior y media de las larvas. Después de cuatro días, las hembras de la primera generación han producido huevos y mueren, pero unas pocas contienen J1, los cuales emergen desde el cuerpo de las hembras y migran a todas partes de la larva. Después de seis días, aparecen los J3 (ciclo corto) y a los ocho días los adultos de la segunda generación (Cuadro 1). Al noveno día, los huevos producidos por la segunda generación de hembras se desarrollan a J1, éste muda a J2 y, al décimo día, son abundantes los J3. A esta temperatura, el ciclo corto dura seis días y el largo, diez días (Figura 1).

A 24°C, el J3 desarrolla la primera generación de machos adultos en un día y hembras, en día y medio. Los J3 (ciclo corto) y la segunda generación de adultos aparecen a los cinco días, sin embargo, algunas de estas hembras contienen J1. Los huevos producidos por la segunda generación de hembras llegan a ser J3 en ocho días. Cerca del 7% de larvas de *G. mellonella* contiene un número grande de adultos muertos. El ciclo de vida corto dura cinco días y el largo, ocho días (Cuadro 1).

A 30°C, los J3 ingresan en el hospedero y llegan a ser machos adultos, pero, sólo, viven tres días. En cuanto a las hembras preadultas, no se desarrollaron a adultas y mueren en un día.

A las temperaturas de 33, 35 y 37°C, los nemátodos no alcanzan el estado J4 y mueren y sólo, en un 45% de las larvas se encontraron juveniles infectivos internos.

#### Influencia de la temperatura en la relación de sexos de la primera generación de adultos.

De acuerdo con la prueba de Ji-Cuadrado, la oscilación de hembras y machos obtenidos en la primera generación son dependientes de la temperatura ( $X^2=12,03$ ;  $gl=2$ ;  $P=9,21$ ;  $(=0,01)$ ). A 15°C, la relación hembras/machos fue de 1,6:1 (22/13); a 24°C, de 1,8:1 (8/4) y, a 30°C, de 0,9:1 (5/6) (Cuadro 2). Cuando las temperaturas se incrementan desde 15 a 24°C, el porcentaje de hembras permanece constante ( $P<0,01$ ), pero, cuando la temperatura se incrementa de 24 a 30°C, el porcentaje de hembras decrece notablemente ( $P<0,01$ ). Las observaciones realizadas, muestran que un macho puede copular con más de una hembra y, por lo tanto, una cantidad grande de hembras a 15°C (Cuadro 2) puede incrementar la producción de juveniles infectivos. Sin embargo, al exponer hospederos con nemátodos a temperaturas superiores de 24°C con este nemátodo, se presenta la posibilidad de obtener una cantidad grande de machos, lo cual imposibilita la obtención y multiplicación de juveniles infectivos. Así mismo, se presentan diferencias significativas en cuanto al número de hembras/machos por larva a 15°C, lo mismo que el porcentaje de hembras a 15-24°C y el porcentaje de machos a 30°C (Cuadro 2).

#### DISCUSION

La habilidad de los juveniles infectivos para descubrir y penetrar el hospedero constituye el paso esencial en el ciclo de vida de *Steinernema feltiae* y, posiblemente están condicionados por estímulos de compuestos nitrogenados de los residuos fecales y por solventes orgánicos de la cutícula de *G. mellonella*. Esto lo reportaron Akhurst y Dunphy (1993), estableciendo que los juveniles infectivos son atraídos por ácido úrico, xantina, amonio y ácido orgánico. Otros factores que afectan la penetración son las defensas comportamentales del hospedero, como la alta tasa de defecación para reducir la infección por el ano (Scarabeidae), bajo volu-

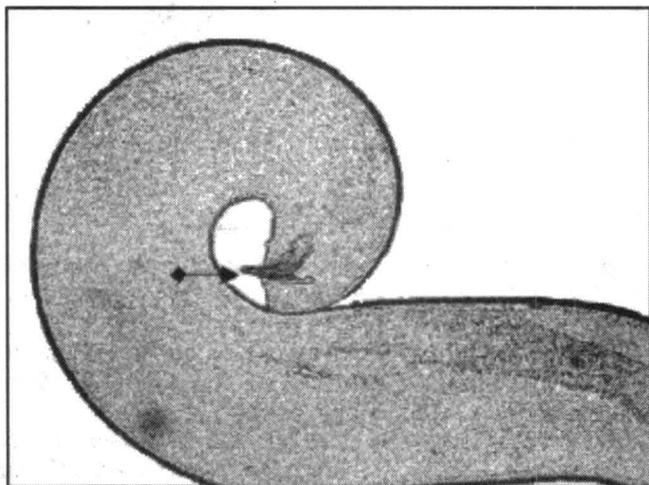


Figura 9. Espículas de macho de primera generación del entomonemátodo nativo *Steinernema feltiae*.

(55%) no se incrementó y están inmóviles y mueren. El 45% restante mudan a J2 y, a los 25 días, aparece el J3. A esta temperatura, sólo, se presentó el ciclo corto (una generación) con una duración de 25 días.

A 15°C, los juveniles infectivos desarrollan a los seis días, la primera generación de machos y hembras, no son muy activos y, a los cinco días después de expuesto el hospedero, aparece la se-

Cuadro 1. Influencia de la temperatura en el ciclo de vida del nemátodo nativo *Steinernema feltiae*.

#### DURACION EN DIAS

TEMP °C	MUERTE LARVA <sup>+</sup>	1GA <sup>*</sup>	2GA <sup>**</sup>	CICLO CORTO	CICLO LARGO
10	120	12	NP	25	NP
15	93	6	5	10	17
20	48	3	8	6	10
24	26	1	5	5	8
30	24	NC	NP	NP	NP
33	-----	NP	NP	NP	NP
35	-----	NP	NP	NP	NP
37	-----	NP	NP	NP	NP

+ Tiempo en horas. 1GA\*: primera generación de adultos. 2GA\*\*: segunda generación adultos. NP: no se presentó. NC: no se completó.

gunda generación de adultos y el J3, a los 14 días; sin embargo, una alta producción de éstos aparece a los 17 días, tiempo en el cual finaliza el ciclo de vida (Cuadro 1).

A 20°C, los J3, a los tres días de expuestos al hospedero desa-

Cuadro 2. Número y porcentaje de hembras y machos de primera generación de *Steinernema feltiae*.

TEMP °C	No. HEMB	% HEMB	No. MACH	% MACH	TOTAL
15	22±21* (3-63)	62±11* (35-75)	13±11* (1-32)	38±11 (25-64)	35±33 (4-95)
24°C	8±7 (2-26)	62±6* (54-74)	4±3 (1-15)	38±6 (26-45)	12±11 (3-41)
30°C	5±5 (1-18)	43±29 (8-100)	6±5 (1-20)	56±29* (26-100)	12±10 (1-38)

Medias y desviaciones seguidas por \* son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ( $\alpha=0,01$ ).

men o liberación de CO<sub>2</sub> (Lepidoptera), remoción de los juveniles de las partes bucales (Scarabeidae), entre otras.

El ciclo de vida del nemátodo nativo *S. feltiae* es similar al descrito para otras especies de Steinernemátidos. Se presenta ciclo corto (una generación de adultos) y ciclo largo o normal (dos generaciones de adultos). El ciclo de vida es dependiente de la temperatura y no es completado a altas temperaturas (30° a 37°C), pues posiblemente afectan la producción de esperma, huevos o un cambio en el comportamiento de apareamiento de los nemátodos. Para presentarse dos generaciones, la temperatura óptima se encuentra entre 20° y 24°C, y este rango da la probabilidad de que los nemátodos sobrevivan a climas cálidos. Sin embargo, la duración en mayor tiempo del ciclo de vida (15°C) o, sólo, el desarrollo del ciclo corto (10°C) confirma la posibilidad de utilizar este nemátodo en climas fríos, ya que está adaptado a estas condiciones. Además, existen algunas similitudes en los efectos de la temperatura en el ciclo de vida del nemátodo nativo y los reportados por Molyneux (1986), trabajando con *S. feltiae*. Este autor establece que, a 10°C, los juveniles infectivos mudan a J4, pero mueren después de cuatro semanas sin desarrollarse; a 12°C; unos pocos J3 emergen desde el 10% de los cadáveres infectados de *G. mellonella* después de 10 semanas. A 28° y 32°C, sólo la primera generación de adultos es producida en los cadáveres infectados. Por lo tanto, de acuerdo a las observaciones de Poinar (1990), el nemátodo nativo se puede establecer en los rangos de temperatura que son favorables para el crecimiento y reproducción de *S. feltiae*, no obstante, que el nemátodo nativo es más tolerante a temperaturas bajas que la cepa trabajada por Molyneux. Además, su ciclo de vida tiene una duración de ocho y diez días a las temperaturas óptimas para este ensayo. También *S. feltiae* presenta diferencias en tamaños entre los individuos, siendo la primera generación de mayor tamaño que la segunda.

El número promedio de hembras y machos de la primera generación es de 35 individuos, producidos en larvas de *G. mellonella* a 15°C. Este número es, aproximadamente, dos y tres veces más que el número producido a 24° y 30°C, respectivamente. Una razón para el gran número de hembras y machos a 15°C puede ser debida a que los nemátodos han sido mantenidos a 8°C y las larvas a 22°C. La temperatura de 15°C disminuye la actividad de las larvas,

pero incrementa la actividad de los nemátodos; de esta forma, a una alta cantidad de J3 ingresan a las larvas de *G. mellonella*. Esta información puede ser útil para producir grandes poblaciones de juveniles infectivos en cultivo *in vivo*. Además, si los J3 almacenados a 8°C y las larvas hospederas mantenidas a temperatura ambiente, se colocan a 15°C hasta cuando las larvas mueran y, posteriormente, se transfieren a 20° ó 24°C para el desarrollo de los nemátodos, grandes cantidades de juveniles infectivos podrán ser producidos.

- En conclusión se puede señalar que: Los atributos de *Steinernema feltiae*, relacionados con el tiempo de generación corto, ofrece posibilidades para su continua manipulación experimental y de desarrollo de modelos de aplicación en invernadero y en campo.
- El ciclo de vida de *Steinernema feltiae* está relacionado directamente con la cantidad de alimento disponible, presentando dos generaciones en *Galleria mellonella*.
- El número de infectivos producidos por un hospedero depende del tamaño, especie, susceptibilidad y tiempo tomado por el complejo nemátodo/bacteria para ocasionar la muerte del hospedero.
- Los resultados presentados son el punto de partida para el desarrollo de metodologías de multiplicación, pruebas de patogenicidad en laboratorio y en campo con ésta y otras especies de nemátodos.
- Los entomonemátodos son un importante grupo de enemigos naturales capaces de causar la muerte o debilidad de una amplia gama de insectos hospedantes. Por ello, las investigaciones basadas en la biología, ecología, patogenicidad, entre otras, y la búsqueda de numerosas especies nativas ofrecerán, a través de investigaciones futuras, una nueva alternativa para la regulación poblacional de insectos; pero, los nemátodos entomopatógenos no pueden ser vistos como un componente único de manejo y, por el contrario, ellos pueden representar una táctica en la serie de opciones biológicas, químicas y culturales disponibles para el manejo de plagas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. P. Stock, curadora de la colección nematológica de la UCDAVIS, California, por su continua asesoría en el desarrollo de este trabajo, y a CINDEC, por su apoyo económico para esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- AKHURST, R. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes - the power behind the throne. En: Nematodes and the Biological Control of Insect Pests. CSIRO. Publications. Victoria, Australia. P. 127-135. 1993.
- AKHURST, R. y G. DUNPHY. Tripartite Interactions between Symbiotically Associated Entomopathogenic Bacteria, Nematodes, and Their Insect Hosts. En: Parasites and Pathogens of Insects (Beckage, N., Thompson, S and Federici, B, eds) Academic Press, INC. p. 1-23. 1993
- BEDDING, R.A. Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27: 109-114. 1981.

- BEDDING, R.A. Large-scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* sp. and *Heterorhabditis*. *Ann Ap.l. Biol.* 101: 117-120. 1984.
- BOVIEN, P. Some types of association between nematodes and insects. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening* 101: 1-114. 1937.
- CAICEDO, A.M y A. BELLOTTI. Reconocimiento de nemátodos entomopatógenos nativos asociados con *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología.* 22(1): 19-24. 1996.
- DUNPHY, G.B. y G.S. THURSTON. Insect immunity. En: *Entomopathogenic nematodes in biological control* (Gaugler, R and Kaya, H, eds). CRC Press, Boca Raton. Florida. p. 301-323. 1990.
- DUTKY, S.R Nematode parasites. En: *Proceedings of the summer institute on biological control of plant insects and diseases* (F.G. Maxwell and F. A. Harris, eds). Jackson. University press of Mississip.i. p. 576-590. 1974.
- FILIPJEV, I.N. Eine neue art der gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bemerkungen uber die systematische sellung der letzteren. *Magasin de parasitologie de l'Institut zoologique des sciences de L'USSR.* IV: 229-240.
- FRIEDMAN, M. Commercial production and development. En *Entomopathogenic nematodes in biological control* (Gaugler, R y Kaya, H, eds.). Boca Raton, Florida. CRC. Press. p. 153-172. 1990.
- GARZON, M. y B. AZA.. Potencial del nemátodo (*Steinernema* sp) para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hust). Tesis Ing. Agrónomo Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.p. 110. 1994
- GARZON, M., B. AZA, J. JIMENEZ, y J. LUQUE. Potencial del nemátodo *Steinernema* sp para el control biológico del gusano blanco de la papa. *Revista Colombiana de Entomología.* 22(1): 25-30. 1996.
- GLASER, R. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*). Circular No. 211. State of New Jersey. Department of Agriculture. 1932.
- KAYA, H. y P. STOCK. Manual of Techniques in Insect Pathology Techniques in insect Nematology. Academic Press. N.Y. p. 281-324. 1997.
- KOP.ENHOFER, A.M; H. KAYA. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control.* 8: 131-137. 1997.
- MOLYNEUX, A.C. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* sp. (nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insect. *Rev. Nematol.* 8: 165. 1985.
- MOLYNEUX, A.C. *Heterorhabditis* sp and *Steinernema* (= *Neoaplectana*) sp.: Temperature and aspects of behavior and infectivity. *Experimental Parasitology* 62:169-180. 1986.
- ORTIZ, L. E. Control microbiano de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterigidae) con el nemátodo *Steinernema carpocapsae* en Tumacó (Nariño). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. p. 97. 1994.
- POINAR, G. Nematodes for biological control of parasitism of larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Nematol.* 15: 351-358. 1979
- POINAR, G. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* (Gaugler, R y Kaya, H, eds.). CRC Press Boca Raton. p. 75-87. 1990.
- SAENZ, A.A. *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae) ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias, área de énfasis Entomología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. p. 125. 1998.
- STOCK, P. Sistemática y Biología de nemátodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional del Litoral, Esperanza. Santafé de Argentina. p. 100. 1998.
- TRAVASSOS, L. Sobre o genera *Oxysomatium*. *Boletim Biologico* (Sao Paulo) 5: 20-21. 1927.
- WOUTS, W. M. The Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda: Steinernematidae). *J. Nematol.* 12:62-72. 1980.