

Laboratorio de Nematología, Centro de Zoología Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba.
Casilla de Correo 122. 5000 Córdoba, Argentina

UNA NUEVA POBLACION DE *HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA* POINAR, 1975 (HETERORHABDITIDAE) DE RIO NEGRO, ARGENTINA: CARACTERIZACION Y ACCION SOBRE EL HUESPED

por

M. M. A. DE DOUCET y M. A. BERTOLOTTI

Resumen. Se describe una población de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 de Río Negro (RN), Argentina. Se estudian sus caracteres morfológicos y morfométricos y se señala su acción sobre el huésped. Esta población se compara con una procedente de Córdoba (RIV). El nematodo en estudio fue aislado de muestras de suelo procedentes de Río Negro mediante técnica rápida. Los nematodos fueron obtenidos y procesados según técnicas standard. Los caracteres morfométricos amplían los rangos conocidos, a diferencia de los morfológicos que son semejantes a los descriptos para otras poblaciones. Los insectos muertos mantienen la coloración y no producen bioluminiscencia. El estudio comparativo con RIV mostró diferencias significativas entre los caracteres morfométricos de todos los estadios (hermafroditas, larvas, hembras y machos). Los resultados ponen de manifiesto la importancia de caracterizar correctamente las diferentes poblaciones de *H. bacteriophora*.

Summary. A new population of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1975 (*Heterorhabditidae*) from Río Negro, Argentina: Characterization and effects on host. A new population of the entomogenous nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975, from Río Negro, Argentina is described and its effect on its host is analyzed. Morphometric and morphological characters of this populations (RN) and another from Córdoba (RIV) were compared. *H. bacteriophora* RN was extracted from soil samples from Río Negro using the rapid method for entomogenous nematodes. The nematodes were reared and processed by standard methods. The analysis of morphometrical characters broadens the ranges known for this species, but morphological characters are similar to those already reported. Parasitized insects do not change their colour and do not produce bioluminescence. There are significant differences between RN and RIV populations in the measurements of all the stages. The need for a correct characterization of *H. bacteriophora* populations is emphasized.

Heterorhabditis bacteriophora Poinar, 1975 se caracteriza por ser un nematodo entomopatógeno y estar relacionado con bacterias endosimbiontes del género *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae) (Boemare y Doucet, 1996). La multiplicación de las bacterias genera bioluminiscencia y cambios en la coloración del insecto, tornándose rojizo (Poinar, 1975a; 1979; 1990; Akhurst y Boemare, 1990). A esta generalidad cabe una excepción, la de un *Heterorhabditis*

sp. aislado en Australia cuya bacteria no presenta bioluminiscencia (Boemare y Akhurst, 1988).

Dado el interés práctico que revisten, en la lucha contra insectos plaga (Gaugler y Kaya, 1990; Wouts, 1991; Doucet y Laumond, 1996) es necesaria su correcta identificación y por lo tanto, imprescindible caracterizar las distintas poblaciones a fin de precisar los límites de la especie.

La distribución de *H. bacteriophora* es amplia, abarcando las regiones holártica, australiana y neotropical (Poinar, 1990). En Argentina, estudios realizados en Córdoba, revelaron su presencia en departamentos del centro y sur (Doucet y Bertolotti, 1994). Recientemente, una nueva población ha sido localizada en la provincia de Río Negro.

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar morfológicamente y morfométricamente la población aislada en Río Negro (RN), comparar esta población con otra de Argengina, procedente de Río Cuarto (RIV), cuyos límites se conocen en detalle, y determinar la acción que ejerce sobre el huésped.

Materiales y métodos

H. bacteriophora RN fue aislada a partir de muestras de suelo procedentes de una plantación de *Malus sylvestris* Mill. (Fam. Rosaceae) en Río Negro durante 1991.

Las larvas infectantes se detectaron mediante técnica rápida (Doucet, 1986).

La multiplicación del nematodo y las observaciones de los huéspedes parasitados se realizaron sobre larvas de *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae). Los estadios considerados fueron: hermafroditas, hembras, machos y larvas infectantes (tercer estadio larval) obtenidos y procesados según técnicas standard (Stanuszek, 1974; Poinar, 1975b).

Los caracteres morfométricos considerados fueron los que usualmente se utilizan para descripciones de nematodos entomófagos (Stanuszek, 1974). Se analizaron treinta individuos de cada estadio y para cada carácter morfométrico se calculó: rango, media y desviación standard.

El estudio comparativo con *H. bacteriophora* RIV (Doucet y Doucet, 1986) se realizó mediante un análisis de varianza. A fin de establecer diferencias entre ambas poblaciones se consideró el valor de F cuando éste fue significativo ($P < 0.001$) (Sokal y Rohlf, 1980).

Resultados

DESCRIPCION (FIG. 1) (Tabla I)

a. Hermafroditas

Cuerpo cilíndrico y alargado. Cutícula lisa. Región anterior levemente redondeada. Boca terminal rodeada por seis labios. Esófago en forma de clava con bulbo basal piriforme. Anillo nervioso rodeando al esófago en proximidad del istmo. Poro excretor situado generalmente a nivel del bulbo basal. Vulva prominente en la región media del cuerpo. Cola corta terminada en punta.

b. Hembras

Morfométricamente distintas de las hembras de la generación hermafrodita, son semejantes en cuanto a la morfología. Cabe señalar la presencia de una vulva fuertemente cuticularizada.

c. Machos

Testículo simple y flexionado. Aparato copulador representado por un par de espículas simétricas. Gubernáculo presente. Bursa copulatrix sostenida por nueve pares de papilas, tres preanales y seis postanales.

d. Larvas infectantes

Cuerpo fino y alargado, cubierto por una doble cutícula: La propia y la correspondiente al estadio larval anterior (segundo estadio). Esta cutícula presenta estriaciones longitudinales y transversales muy marcadas en el primer tercio de su longitud, lo que le confiere un aspecto cuadrículado. Estas estraciones se hacen menos evidentes en el resto del cuerpo. Región anterior redondeada. Presencia de un diente dorsal. Esófago con bulbo basal piriforme. Poro excretor a nivel del istmo. Hemizonidio situado por encima del poro excretor. Presencia de bacterias en la 1ra. porción del intestino.

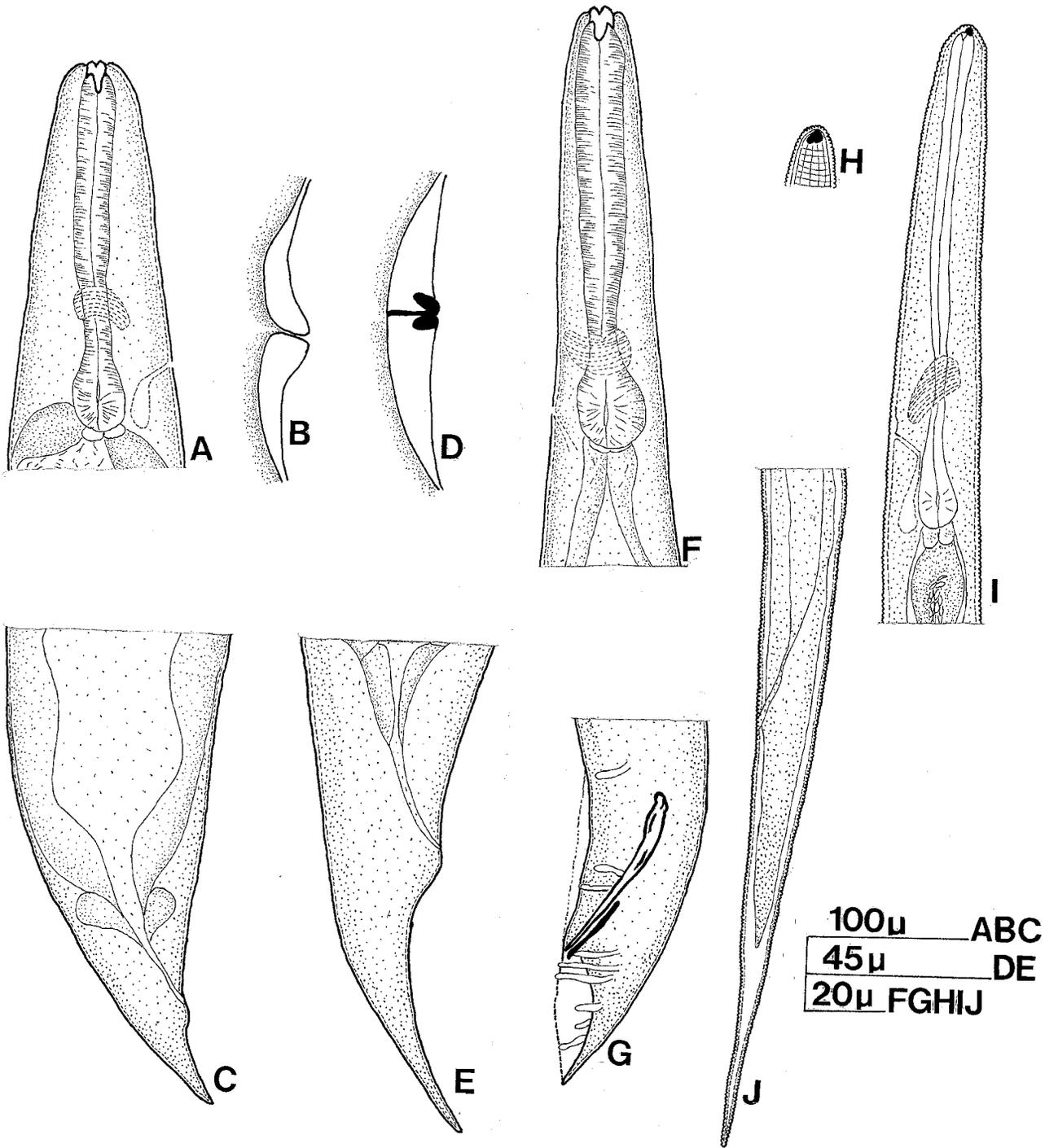


Fig. 1. *Heterorhabditis bacteriophora* de Río Negro, hermafrodita: A, región esofágica; B, región vulvar; C, región caudal; hembra: D, región vulvar; E, región caudal; macho: F, región esofágica; G, región caudal; larva infectante: h, región anterior; I, región esofágica; J, región caudal.

TABLA I - Valores morfométricos de *Heterorhabditis bacteriophora* de Río Negro y de Córdoba, Argentina.

Caracteres	hermafrodita		hembra		macho		larva infectiva	
	RN	RIV	RN	RIV	RN	RIV	RN	RIV
Longitud (L) total	3.46±0.78 (2.4-4.8)	5.01±0.41*	1.83±0.12 (1.65-2.15)	2.14±0.17* (1.8-2.4)	0.938±0.044 (0.85-1.03)	0.845±0.057* (0.70-0.94)	603±19.67 (560-640)	601.8±26.26 (530-660)
Ancho (A) máximo	185.75±24.03 (145-222.5)	202.6±16.99 (175-242)	112.9±8.20 (95-127.5)	123.46±13.39* (100-162)	43.56±1.63 (40-47)	44.63±2.94 (37-50)	23±0.78 (22-25)	25.66±1.70* (22-30)
L. extremo anterior poro excretor	175.58±23.27 (142.5-212.5)	189.93±13.65 (163-225)	131.25±8.34 (117.5-150)	149.76±8.33* (122-162)	88.36±4.52 (78-98)	129.2±6.07* (113-140)	96.76±4.93 (90-112)	100.2±3.69 (93-108)
L. extremo anterior anillo nervioso	136.41±17.26 (107.5-167.5)	138.86±8.37 (125-152)	95.75±6.47 (82.5-107.5)	93.23±5.20 (83-102)	77.46±3.78 (70-85)	77.26±3.47 (70-85)	80.06±3.75 (73-86)	83.23±2.76* (80-90)
L. extremo anterior bulbo basal	189.41±23.83 (155-225)	199.03±8.25 (180-220)	35.83±5.62 (25-45)	133.63±6.77 (108-145)	101.9±3.06 (94-107)	102.2±3.44 (95-110)	116.3±4.16 (108-122)	120.0±5.10 (110-130)
A. cuerpo a nivel poro excretor	104.76±14.65 (77.5-127.5)	118.03±8.52* (103-142)	67.58±5.27 (55-77.5)	–	27.83±0.94 (25-29)	–	21.36±0.49 (21-22)	–
A. cuerpo a nivel anillo nervioso	89.91±11.28 (70-110)	99.26±6.05* (90-112)	55.41±4.05 (50-65)	–	26.86±1.008 (25-29)	–	20.46±0.57 (20-22)	–
A. cuerpo a nivel bulbo basal	112.08±15.25 (90-145)	118.83±9.98 (95-134)	68.75±4.58 (60-77.5)	–	30.23±1.006 (28-32)	–	21.96±0.76 (21-24)	22.86±1.25 (19-25)
L. cola	61.16±8.97 (47.5-87.5)	72.8±7.09* (50-87)	67.41±4.61 (60-77.5)	54.46±4.83* (40-65)	30.33±2.03 (26-35)	24.1±1.76* (20-27)	101.5±6.72 (88-113)	94.46±5.00* (84-105)
A. cuerpo a nivel ano	35.16±9.30 (22.5-55)	53.3±3.66* (45-62)	26.25±2.60 (22.5-32.5)	27.7±3.79 (23-40)	20.2±1.42 (18-25)	22.1±1.27* (20-25)	15.25±1.20 (13-17)	15.90±0.75 (14-17)
Indice V	45.80±2.96 (39.53-50.9)	40.53±1.54* (35-45)	46.51±1.52 (42.7-48.9)	46.73±2.37 (41-50)	–	–	–	–
Indice A	–	–	–	–	–	–	26.24±1.16 (23.75-28.63)	23.51±1.32* (20.5-26.04)
Indice B	–	–	–	–	–	–	5.18±0.17 (4.86-5.59)	5.01±0.27 (4.30-5.77)
Indice C	–	–	–	–	–	–	5.95±0.37 (5.22-6.66)	6.34±0.31* (5.85-7.00)
Indice D	–	–	–	–	–	–	0.83±0.03 (0.77-0.94)	0.83±0.03 (0.75-0.93)
Indice E	–	–	–	–	–	–	0.95±0.07 (0.82-1.10)	1.06±0.05* (0.95-1.17)
L. testículo origen-flexión	–	–	–	–	97.23±7.33 (80-114)	88.7±11.52 (75-115)	–	–
L. testículo flexión-ano	–	–	–	–	0.64±0.036 (0.57-0.70)	0.62±0.05 (0.49-0.70)	–	–
L. espícula	–	–	–	–	48.03±2.10 (45-53)	43.33±2.02* (39-47)	–	–
L. gubernáculo	–	–	–	–	19.2±2.32 (14-23)	20.7±1.53 (18-24)	–	–

Las medidas se indican en μm , excepto las longitudes total y del testículo desde la flexión hasta el ano (en mm). La disposición de los valores corresponde a: Media \pm Desvío Standard (Rango). * Diferencias significativas entre RN y RIV ($P < 0.001$).

El análisis de varianza entre las poblaciones RN y RIV arrojó diferencias significativas en los caracteres morfométricos de los cuatro estadios (Tabla I).

En hermafroditas, las diferencias se observan en longitudes total y de la cola; anchos del cuerpo a nivel del ano y del bulbo basal; índice V. Esto representa el 55% del total de caracteres considerados.

En hembras, las diferencias aparecen en longitudes total, del extremo anterior al poro excretor y de la cola; ancho máximo y del bulbo basal. Igualmente, ésto es el 55% de los caracteres observados.

En machos, corresponden a longitudes total, del extremo anterior al poro excretor, de la cola y de la espícula; ancho del cuerpo a nivel del ano. Esto representa el 41.6% de los caracteres.

En larvas infectantes, presentan diferencias significativas las longitudes del extremo anterior al anillo nervioso y de la cola; anchos máximo y del bulbo basal; e índices a, c y e. Esto corresponde al 50% de los caracteres considerados.

Observaciones biológicas

La fase parasitaria comienza cuando el nematodo penetra en el insecto, atraviesa la pared intestinal y se dirige al hemocel, allí libera las bacterias endosimbiontes y la muerte del huésped sobreviene entre 24 y 48 horas después.

Las larvas de *G. mellonella* muertas por la acción de los nematodos conserva la coloración gris típica; en un ambiente oscuro, no se observó luminiscencia.

El ciclo parasitario concluye cuando nuevas larvas infectantes abandonan el cadáver del insecto, entre los 11 y 12 días después de la infección. Junto con las larvas infectantes emergen otros estadios juveniles y también adultos, contenidos en el insecto.

Discusión

El estudio de los caracteres morfométricos de la población RN amplía los rangos conocidos para la especie, en particular: longitudes total; del extremo anterior al poro excretor, al anillo nervioso y al bulbo basal; de la cola, de la espícula y del gubernáculo; anchos máximo y del cuerpo a nivel del ano; e índice V.

En cuanto a los caracteres morfológicos, son semejantes a los descritos para otras poblaciones (Poinar, 1975a; Doucet y Doucet, 1986; Doucet *et al.*, 1996).

El análisis entre las poblaciones RN y RIV evidenció diferencias significativas en adultos y corresponden a las longitudes total, del extremo anterior al poro excretor, de la cola y de la espícula; anchos máximo y a nivel del ano. Por el contrario, en el estadio infectante, no se registraron diferencias significativas, en particular en los caracteres: longitudes total, del extremo anterior al poro excretor y del extremo anterior al bulbo basal. Estos resultados corroboran observaciones anteriores en donde se demostró que en adultos los caracteres son muy variables, ya que pueden ser influenciados por las condiciones de cría, en cambio las larvas infectantes son menos afectadas por dichos factores (Doucet *et al.*, 1991).

La coloración característica y la bioluminiscencia provocada por las bacterias endosimbiontes asociadas a estos nematodos, no fue observada en este aislado. En efecto, los insectos parasitados conservaron su color gris típico y no se registró emisión de luz. Es conocido que la producción de pigmento y la manifestación del color son variables según las cepas de bacterias; ello daría lugar a la aparición de diferentes fenotipos, más o menos pigmentados (Boemare y Akhurst, 1988).

En función de la dificultad de mantener en laboratorio los cultivos de este aislado, podría tratarse, dada la falta de sincronización de la emergencia de las larvas infectantes, de un nematodo que habría perdido por error la bacteria asociada (Boemare y Doucet, 1996).

Los resultados alcanzados señalan la importancia de caracterizar correctamente las poblaciones y la conveniencia de considerar el estadio infectante para el reconocimiento de *H. bacteriophora*. El color de los insectos parasitados y la bioluminiscencia tienen un valor relativo en la determinación de los nematodos.

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de CONICOR, CONICET y SECYT (UNC).

Obras citadas

- AKHURST R. J. y BOEMARE N. E., 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pp. 75-90. *En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (R. Gaugler and H. K. KAYA, Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BOEMARE N. E. y AKHURST R. J., 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.*, 134: 751-761.
- BOEMARE N. y DOUCET M. M. A. de, 1996. Estudio de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* spp., bacterias asociadas a los nematodos entomopatógenos. *En: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas*. Ed. Lecuona. Sudamericana (en prensa).
- DOUCET M. M. A. de, 1986. Técnica rápida para detectar nematodos entomófagos. *Rev. Cs. Agrop.*, 5: 57-63.
- DOUCET M. M. A. de y BERTOLOTTI M. A., 1994. Nuevos registros de nematodos entomófagos (Steinernematidae; Heterorhabditidae) en Córdoba, Argentina. *En Actas: XI J. Cient. Soc. Biol. de Tucumán*, No. 38. San Pedro de Colalao, Tucumán. 6, 7 y 8 de Octubre de 1994.
- DOUCET M. M. A. de, BERTOLOTTI M. A. y CAGNOLO S. R., 1996. On a new isolate of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Nemata: Heterorhabditidae) from Argentina: life cycle and description of infective juveniles, females, males and hermaphrodites of 2nd. and 3rd. generation. *Fund. appl. Nematol.* (en prensa).
- DOUCET M. M. A. de y DOUCET M. E., 1986. Nuevos datos para el conocimiento de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975. *Rev. Inv. Agrop.*, 21: 1-10.
- DOUCET M. M. A. de, DOUCET M. E. y BERTOLOTTI M. A., 1991. Efecto de la temperatura de cría e intensidad de infestación sobre los caracteres morfológicos de *Heterorhabditis bacteriophora*. Análisis de variabilidad. *Nematropica*, 21: 37-49.
- DOUCET M. M. A. de y LAUMOND C., 1996. Uso de nematodos entomopatógenos a campo. *En: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas*. Ed. Lecuona. Sudamericana. (en prensa)
- GAUGLER R. y KAYA H. K., 1990. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press Ed. Boca Raton, Florida. 365 pp.
- POINAR G. O. JR., 1975a. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.
- POINAR G. O. Jr., 1975b. *Entomogenous nematodes. A manual and host list of insects nematode associations*. E. J. Brill Leiden, NY, 317 pp.
- POINAR G. O. JR., 1979. *Entomogenous nematodes for biological control*. CRC Press Ed. Boca Raton, Florida. 277 pp.
- POINAR G. O. JR., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pp. 40-47. *En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (R. Gaugler and H. K. Kaya, Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- SOKAL R. R. y ROHLF F. J., 1980. *Introducción a la bioestadística*. Reverté Ed., México. 362 pp.
- STANUSZEK S., 1974. Suggestions for the unification of principles for describing nematodes of the genus *Neoalectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Rhabditoidea, Steinernematidae). *Zesz. Probl. Postępow. Nauk Roln.*, 154: 465-471.
- WOUTS W. M., 1991. *Steinernema (Neoalectana) and Heterorhabditis* Species. Pp. 855-897. *En: Manual of Agricultural Nematology* W. R. Nickle, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York.