

Nota Técnica

PATOGENICIDAD DE *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp. SOBRE JOBOTOS DEL GENERO *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae)¹

Edgar Vargas *
Giselle Abarca *

ABSTRACT

Pathogenicity of *Bacillus cereus* and *Erwinia* spp. on white grubs of the genus *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae). A bacterial complex causing the death of white grubs (*Phyllophaga menetriesi* and *P. obsoleta*) was found in different climatic regions of Costa Rica. These bacteria, identified as *Bacillus cereus* and *Erwinia* spp., caused a paralysis of the posterior part of the abdomen (raster), and a general blackening of the body. A 100% mortality was obtained in eggs and L1, L2, and L3 larvae grown under controlled conditions when inoculated with these bacteria. The possibility that the stress caused by disturbing the larvae might predispose them to a faster death by the bacteria is discussed.

INTRODUCCION

El complejo de larvas del suelo, conocido popularmente en Costa Rica como jobotos, fogotos o gallina ciega, está formado por especies de los géneros *Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.

Las larvas de algunas especies de estos géneros, son de importancia económica porque dañan las raíces de una gran gama de especies de plantas.

La existencia de patógenos naturales de las larvas de estos escarábidos, ha sido señalada desde hace varias décadas; por ejemplo, bacterias como *Bacillus popilliae* y *Bacillus lentimorbus* ocasionan la "enfermedad lechosa" a las larvas de *Popillia japonica*, *Cyclocephala immaculata* y *Cyclocephala parallela* (Warren et al., 1983).

Recientemente en Costa Rica, fue encontrado un complejo de bacterias nativas que ocasionan la muerte de estos insectos plaga. Dado su potencial como medida de combate, se decidió estudiar la patogenicidad de dicho complejo bacterial *in vitro* y en el campo sobre las principales especies de jobotos del género *Phyllophaga* presentes en algunas zonas del Valle Central de Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

En junio de 1987, en los campos de cultivo localizados en la provincia de Cartago, fueron colectadas larvas de jobotos del II estadio con síntomas de una enfermedad. Las larvas fueron trasladadas al laboratorio para diagnosticar y confirmar si se trataba de una enfermedad.

Aislamientos y pruebas de patogenicidad *in vitro*

Se hicieron aislamientos en medio de cultivo de agar-papa-dextrosa (PDA), con extracto de

1/ Recibido para publicación el 16 de enero de 1991.

* Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

levadura al 1%, en larvas moribundas provenientes del campo, que presentaban un ennegrecimiento general. Para ello fueron sumergidas durante 3 min en alcohol etílico al 70%, flameadas y posteriormente se les cortó una sección del abdomen, la que fue macerada en 5 ml de agua destilada estéril, en un mortero también estéril. Del líquido obtenido fueron hechos rayados sobre medio de cultivo y se incubaron a 24°C. De los aislamientos obtenidos de una de las larvas, fueron seleccionadas, por su alta frecuencia, colonias de rápido crecimiento, color cremoso y borde uniforme; a éstas se les denominó aislamiento 1. De los aislamientos logrados a partir de otras larvas, fueron obtenidas colonias pequeñas, de crecimiento lento y ligeramente amarillas, de las cuales se seleccionaron 3 tipos diferentes, con base en la morfología, a las que se les denominó aislamientos 2, 3 y 4. Todos los aislamientos fueron mantenidos en suspensión diluida en agua de lluvia esterilizada, a 7°C, en tubos de ensayo. Para las pruebas de patogenicidad fueron preparados platos de Petri de 15 cm de diámetro, estériles, con papel de filtro húmedo en los que se colocaron raíces de plántulas de maíz (*Zea mays*) germinadas en incubadora, como alimento para las larvas. Posteriormente, se colocaron 5 larvas no identificadas, en el estadio más voraz (II estadio) junto con las raíces, y todo el plato se asperjó, con ayuda de un atomizador DeVilvis, con una suspensión turbia de bacterias provenientes de colonias jóvenes. Las cámaras húmedas fueron mantenidas en la oscuridad, en condiciones de laboratorio, durante el transcurso de la prueba. Fueron hechas observaciones cada 48 horas, durante 7 días, para observar la evolución de los síntomas.

Pruebas de patogenicidad en suelo

Cinco larvas de *Phyllophaga obsoleta* y *Phyllophaga menetriesi*, fueron puestas en cada una de 3 macetas, en suelo con alto contenido de materia orgánica, no estéril. Las larvas provenían del campo y fueron utilizadas aquellas que sobrevivieron después de mantenerlas durante 3 meses en el laboratorio, en suelo con maíz; la mayoría fueron del II estadio. Por su mayor patogenicidad en la prueba preliminar *in vitro*, fueron seleccionados los aislamientos 1 y 4, los cuales se pusieron a crecer en el mismo medio usado anteriormente, durante 48 horas; de ahí fue obtenida una suspensión turbia que fue rociada sobre las raíces de plántulas de maíz; 5 de estas plántulas fueron

sembradas en cada maceta. El riego se hizo de tal forma que la humedad se mantuviera a capacidad de campo. Semanalmente fueron hechos recuentos de plantas con raíces dañadas y también se observó a las larvas, considerándose como enfermas aquellas que presentaban parálisis del abdomen, oscurecimiento o muerte; las larvas muertas no fueron sacadas de las macetas.

Frecuencia de la enfermedad

Para determinar la frecuencia de aparición de la enfermedad en los jobotos, se amplió la recolección de larvas de los estadios L1, L2 y L3 en campos de cultivo localizados en las provincias de Cartago, Alajuela y Puntarenas, durante 1988 y 1989.

Una vez trasladadas al laboratorio fueron seleccionadas las larvas sanas y aquellas con síntomas de la enfermedad; a éstas últimas se les realizaron los mismos análisis descritos anteriormente, para corroborar los resultados obtenidos.

Las larvas sanas fueron colocadas, de acuerdo al estadio, en envases plásticos de 0,5 L que contenían suelo, sobre el cual se colocó maíz germinado que se restituyó cada 14 días. Las larvas fueron revisadas a intervalos de 4 días para cotejar su estado (sano o enfermo), durante 12 meses consecutivos. Para determinar si el complejo de las bacterias nativas podrían ocasionar daño a los huevos, pupas o adultos, se decidió estudiar una generación, en condiciones controladas. Se capturó adultos con trampas de luz negra de 40 W, en las zonas de Fraijanes, Alajuela; Vara Blanca, Heredia; Tierra Blanca, Cartago; Liberia, Guanacaste y Moravia, San José, según la metodología propuesta por Guzmán (1980). Estos adultos fueron trasladados al laboratorio y colocados en jaulas de cría de 0,60 x 0,50 x 0,40 m, con el fondo y 3 de sus lados de madera, un lado de vidrio y la parte superior cubierta con cedazo fino. En el interior de la jaula se colocó una bandeja de 0,50 x 0,40 x 0,10 m, cubierta con suelo libre de huevos de jobotos y rico en materia orgánica, sobre el que se colocó una planta de cafeto (*Coffea arabica* cv. Caturra, de 0,20 m de altura). En cada jaula se colocaron entre 20 y 80 adultos con la finalidad de que llevaran a cabo la copulación y la ovoposición. Las jaulas fueron revisadas cada 4 días. Los huevos fueron colectados y sumergidos durante 5 segundos en hipoclorito de sodio al 0,05%; luego, fueron colocados sobre otra bandeja y cubiertos con

una capa de suelo húmedo para que ocurriera la eclosión de las larvas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamientos y pruebas de patogenicidad *in vitro*

En el caso del aislamiento 1, 3 días después de la inoculación, las 5 larvas presentaron parálisis del abdomen y oscurecimiento del mismo, hacia el extremo (raster). A los 7 días, 4 de las 5 larvas estaban muertas. En el caso del aislamiento 4, las larvas presentaron al principio una ligera constricción oscura en la base del abdomen, luego ocurrió parálisis del abdomen y a los 7 días todavía estaban moribundas; las 5 larvas murieron a los 14 días. El aislamiento 3 no fue patogénico, mientras que con el 2 murieron sólo 2 larvas de un total de 5, a los 14 días. En el testigo murió 1 larva de las 5 larvas a los 14 días, con síntomas similares; probablemente venía ya infectada. Aparentemente, la enfermedad se produjo porque las bacterias fueron ingeridas de las raíces o del papel filtro, que también resultó apetecible para las larvas, acompañado esto de una predisposición por estrés en las larvas.

Pruebas de patogenicidad en suelo

De acuerdo con los datos presentados en el Cuadro 1, se observa que durante los primeros 7 días las larvas no mostraron síntomas de la enfer-

medad y la cantidad de plantas dañadas fue similar en todos los tratamientos; no fue sino hasta los 14 días que se presentaron las primeras larvas enfermas, en igual cantidad en ambos tratamientos, indicando una multiplicación rápida de la bacteria en la larva y una acción tóxica de la misma que causó parálisis del abdomen. A partir de los 21 días se incrementó rápidamente el número de larvas enfermas para ambos aislamientos, mientras que el número de plantas dañadas se estabilizó hasta el final. En el tratamiento testigo, a partir de los 21 días, las larvas se mantuvieron prácticamente sin comer, debido a que las plántulas no tenían ya raíces; la única larva que murió presentó un aspecto lechoso al principio. En el caso de ambos aislamientos, algunas larvas salieron a morir a la superficie, pero la mayoría aparecieron momificadas y negras en el fondo de la maceta. Durante todo el período que estuvieron con el abdomen paralizado, no se alimentaron.

Si se compara la respuesta en campo con la prueba *in vitro*, la tendencia fue semejante, sólo que *in vitro* los síntomas se desarrollaron más rápido y la muerte ocurrió súbitamente; probablemente las larvas se estresaron al estar fuera del suelo y las bacterias se multiplicaron más rápido.

Ambos aislamientos se comportaron similarmente en cuanto a su efectividad. Los aislamientos fueron identificados a nivel de género, el 1 como *Erwinia* spp., y el 4 como *Bacillus cereus*. Los síntomas producidos por ellos son ilustrados en la Figura 1.

Cuadro 1. Patogenicidad de dos aislamientos de bacterias (*Bacillus cereus* y *Erwinia* spp.) en larvas de jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col: Scarabaeidae) y su efecto en la protección de plántulas de maíz (*Zea mays*).

Tratamientos	Rep.	Días después de la inoculación						Total					
		7		14		21			28		35		
		A	B	A	B	A	B		A	B	A	B	
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	1	1	3	3	2	3	2	3	2	10	6
	2	0	2	2	2	2	2	3	2	3	2		
	3	0	2	2	2	4	2	4	2	4	2		
<i>Erwinia</i> spp.	1	0	2	2	2	4	2	4	2	5	2	13	6
	2	0	2	1	2	2	2	4	2	4	2		
	3	0	2	2	2	4	3	4	3	4	3		
Testigo	1	0	2	0	4	1	5	1	5	1	5	1	14
	2	0	1	0	3	0	4	0	4	0	4		
	3	0	2	0	3	0	3	0	4	0	4		

A = larvas enfermas; B = número de plantas dañadas.



Fig. 1. Secuencia de los síntomas causados por *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp. en larvas de jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae).

Estos resultados brindan un nuevo enemigo natural para esta plaga, ya que hasta el momento no ha sido informado ninguna *Erwinia* patógena de larvas de jobotos. Tampoco, a pesar de que se ha informado de especies de *Bacillus* patógenas en larvas de escarabajos (Warren *et al.*, 1983), no se había mencionado a *B. cereus* entre las especies dañinas a *Phyllophaga*.

Frecuencia de la enfermedad

Se observó que las larvas de jobotos colectadas en las localidades en estudio, presentaron los síntomas de las bacterias nativas, y en todos los casos, se alcanzó el 100% de mortalidad, como se observa en el Cuadro 2. También las observaciones parecieran indicar que el complejo bacterial podría encontrarse en el suelo o en las raíces en condiciones naturales, en localidades con regímenes climáticos diferentes, de donde es adquirido por las larvas, así como en el follaje de especies de plantas que sirven de alimento a los adultos, tales como frutales, forrajeras y ornamentales (Morón, 1986).

También se constató que el complejo bacterial nativo es capaz de ocasionar la muerte a todos los estadios de esta plaga, como se observa en el

Cuadro 3, donde los huevos se infectaron con dicha enfermedad, en porcentajes que variaron desde 10 hasta 100% de mortalidad. Por otra parte, las larvas que lograron eclosionar, a los pocos días enfermaron y se obtuvo una mortalidad entre 36 y 100% (Cuadro 3).

Durante los meses de muestreo se observó una gran mortalidad de larvas por causa de las bacterias. Se constató que además de infectar a todos los estadios larvales, estos organismos también causaron deformaciones y muerte a los huevos, pupas y adultos. Es posible que la infección de estos estadios se encuentre relacionada con los siguientes factores: a) la desinfección superficial de los huevos utilizada en el presente estudio, no fue efectiva para la eliminación de las formas reproductivas de la bacteria, a pesar de que se usó el método más recomendado para la desinfección de huevos de insectos; y b) los huevos se infectaron internamente con las bacterias del adulto. Todo pareciera indicar que las bacterias coexisten con los jobotos en condiciones naturales, sin embargo, cuando los factores ambientales adversos a la plaga se manifiestan o hay cambios fisiológicos originados al pasar de un estado a otro, se presenta estrés en el insecto, lo que conlleva a una



Cuadro 2. Incidencia de *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp. en larvas de jobotos *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae) en localidades de diferentes regímenes climáticos, en Costa Rica.

Localidad	Zona bioclimática	Total de larvas	Larvas muertas por bacterias	
			número	%
Fraijanes (Alajuela)	Bosque muy húmedo premontano	744	744	100%
Poasito (Alajuela)	Bosque muy húmedo pre-montano	51	51	100%
Cuesta La Chinchilla (Cartago)	Bosque húmedo montano bajo	331	331	100%
Esparza (Puntarenas)	Bosque húmedo tropical	75	75	100%

Cuadro 3. Incidencia de un complejo bacteriano nativo (*Bacillus cereus* y *Erwinia* spp.) sobre los huevos y las larvas (estadio L1) de jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae) en Costa Rica.

Localidad	Huevos muertos por bacterias		Larvas eclosionadas por bacterias	
	Número	%	Número	%
Fraijanes (Alajuela)	11	45,8	5	35,7
	13	56,5	3	37,5
	10	62,5	10	43,5
	9	64,3	11	45,8
	4	80,0	4	50,0
	7	85,6	8	80,0
Tierra Blanca (Cartago)	9	100,0	9	90,0
	9	64,3	5	45,5
Liberia (Guanacaste)	4	80,0	13	76,5
	13	12,5	7	50,0
	10	10,5	85	89,5
	5	50,0	5	100,0

disminución en las defensas y una predisposición para que las bacterias colonicen y ocasionen la muerte.

RESUMEN

Un complejo bacteriano que causa la muerte a jobotos (*Phyllophaga menetriesi*, *Phyllophaga obsoleta*) fue encontrado en diferentes regiones


climáticas en Costa Rica. Las bacterias fueron identificadas como *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp., y causaron una parálisis hacia el extremo posterior del abdomen (raster) y un ennegrecimiento general del cuerpo de las larvas. En pruebas realizadas con huevos y larvas L1, L2, y L3 criadas en condiciones controladas fue obtenido un 100% de mortalidad. Se discute la posibilidad de que el estrés a que son sometidas las larvas al ser disturbadas las pueda predisponer a una muerte más rápida por causa de las bacterias.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Franklin Jiménez (Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica) por la identificación de las bacterias. A Daniel Coto (MIP, CATIE) por la confirmación en la identificación de los jobotos. A Gilbert Fuentes y Róger López (Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica) por su colaboración en la revisión de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- BOUCIAS, D.C.; CHERRY, R.H.; ANDERSON, D.L. 1986. Incidence of *Bacillus popilliae* in *Ligyris subtriticus* and *Cyclocephala oparalella* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Florida sugarcane fields. *Environmental Entomology* 15(3):703-705.

- 
- CANTWELL, G.E. (ed.). 1974. Insect diseases. Nueva York, USA, Marcel Dekker, Inc. p. 1-172.
- MORON, M.A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. México, D.F., Instituto de Ecología. p. 219-235.
- GUZMAN, M.A. 1980. Aspectos sobre la biología de *Phyllophaga menetriesi* (Blanch) (Coleoptera: Scarabaeidae), fluctuación, captura de adultos con trampa de luz negra y hora de mayor incidencia. El Salvador, Instituto Salvadoreño de Investigación del Café. 20 p. (Boletín Técnico no. 6)
- WARREN, G.W.; POTTER, D.A. 1983. Pathogenicity of *Bacillus popilliae* (*Cyclocephala* strain) and other milky disease bacteria on grubs of the Southern Masked Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology 76:69-73.