

## AISLAMIENTO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS

### INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos (NEP's) (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) son habitantes del suelo que parasitan artrópodos, principalmente insectos en estados inmaduros, gracias a que poseen una relación simbiótica con bacterias gram-negativas de los géneros *Xenorhabdus* (THOMAS & POINAR, 1979) y *Photorhabdus* (BOEMARE et al., 1993). Esta simbiosis es altamente eficaz y tiene la capacidad de matar a su hospedante entre 24 y 72 h después del ingreso del nematodo, la coloración del cadáver permite identificar el género de NEP's involucrado (POINAR, 1979) (Figura 1A y B).



Figura 1. Cuadro típico de infección. A. *Photorhabdus*; B. *Xenorhabdus*.

### PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen especies de nematodos entomopatógenos nativos que controlan artrópodos plagas de diferentes cultivos?

### OBJETIVO GENERAL

Aislar nematodos entomopatógenos que controlan artrópodos plagas de diferentes cultivos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar cría de *Galleria mellonella*, para el aislamiento y multiplicación de nematodos entomopatógenos.
- 2) Aislar especies de nematodos entomopatógenos y evaluarlos para el control de plagas en diferentes cultivos.

### RESULTADOS

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Cría de Enemigos Naturales (CICEN) de la Universidad de Caldas y se dividió en tres fases:

- 1) Cría de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Para la cría se utilizó una dieta artificial a base de miel de abejas (225cc), glicerina (150cc), levadura (91g), cera de abejas (45g), salvado de trigo (310g) y germen de trigo (200g) (Figura 2A, B). Una hora después de la preparación se realizó la infestación con larvas del insecto (Figura 2C) y se introdujeron los recipientes en una incubadora Thermo Scientific a 25°C (Figura 2D). Mensualmente se hizo renovación de la dieta.

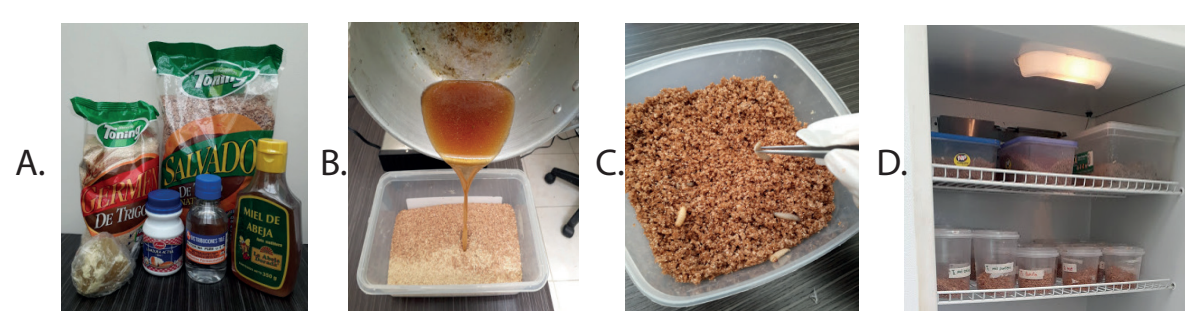


Figura 2. Cría de *G. mellonella*. A. Ingredientes; B. Homogenización de ingredientes; C. Infestación; D. Dietas en incubadora

- 2) Fase de búsqueda y aislamiento.

Para determinar la presencia de NEP's nativos se utilizó la técnica conocida como "insecto trampa" descrita por BEDDING & AKHURST (1975), la cual consistió en depositar 500 g de suelo en un recipiente plástico y 10 larvas de último instar de *G. mellonella* (Figura 3A, B y C).

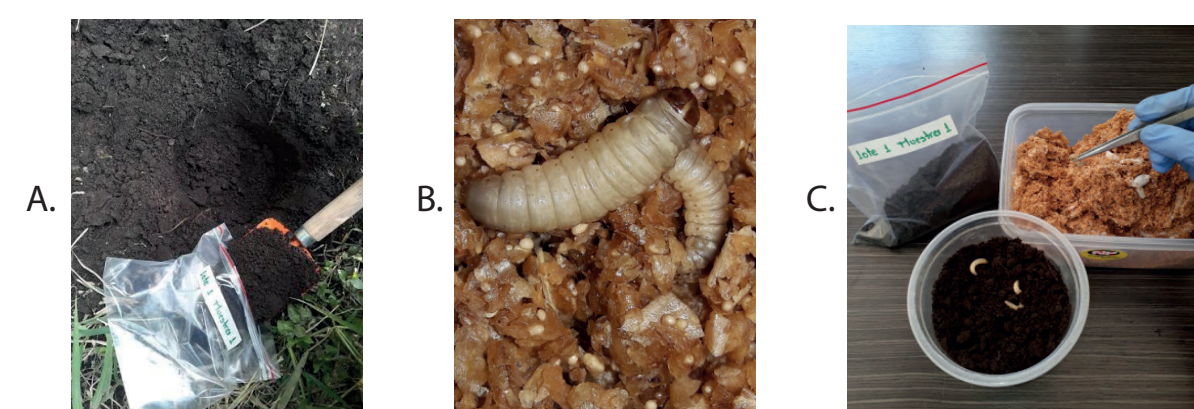


Figura 3. Búsqueda. A. Muestra de suelo; B. Larvas de 5º instar de *G. mellonella*; C. Infestación.

A partir del quinto día se inició la extracción de larvas de *G. mellonella* muertas (Figura 4A), estas se ubicaron en cajas petri, posteriormente se sometieron a un periodo de incubación de 72 h a 25 °C. Las larvas que presentaron síntomas por ataque de nematodos se ubicaron en trampa "White" modificada por KAYA & STOCK (1997), con el fin de aislar NEP's. La trampa White consistió en ubicar una caja petri de 55 mm x 8 mm con papel filtro Whatman No.1 dentro de una caja petri de 94 mm x 16 mm con 20 ml de agua lluvia, sobre la cual se depositaron las larvas de *G. mellonella* con síntomas de infección por NEP's (Figura 4B).

Las larvas infectadas permanecieron durante 9 días en las respectivas trampas mientras que los nematodos migraron al agua, la cosecha de NEP's se realizó a los 5, 7 y 9 días (Figura 4C). Finalmente, se observó la actividad de los NEP's contando el número de juveniles infectivos en 10 alícuotas (10 µl) (Figura 4D), posteriormente, se ubicaron en un refrigerador a temperatura promedio de 13 °C ± 1 durante 15 días.

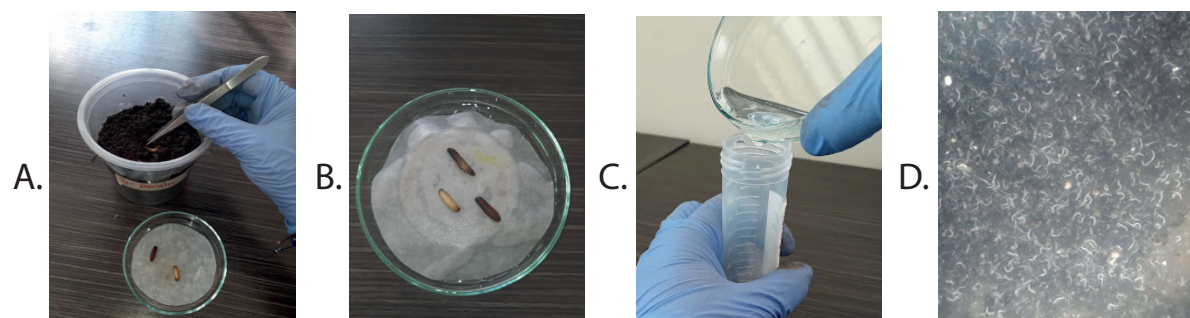


Figura 4. Aislamiento. A. Extracción; B. Trampa "White"; C. Cosecha; D. Nematodos entomopatógenos

- 3) Pruebas de patogenicidad (in vitro).

Se seleccionaron los aislamientos de NEP's que presentaron mayor virulencia sobre *G. mellonella* (Figura 5A) y se realizaron inoculaciones sobre larvas de chizas mediante el método de inmersión. Se observó mortalidad del insecto 72h después de la inoculación, posteriormente las larvas muertas se sometieron al mismo proceso de aislamiento de NEP's descrito para *G. mellonella* (Figura 5B). La patogenicidad de los JI se comprobó mediante re-infecciones sobre larvas de chizas, de acuerdo a los postulados de Koch (Figura 5C).

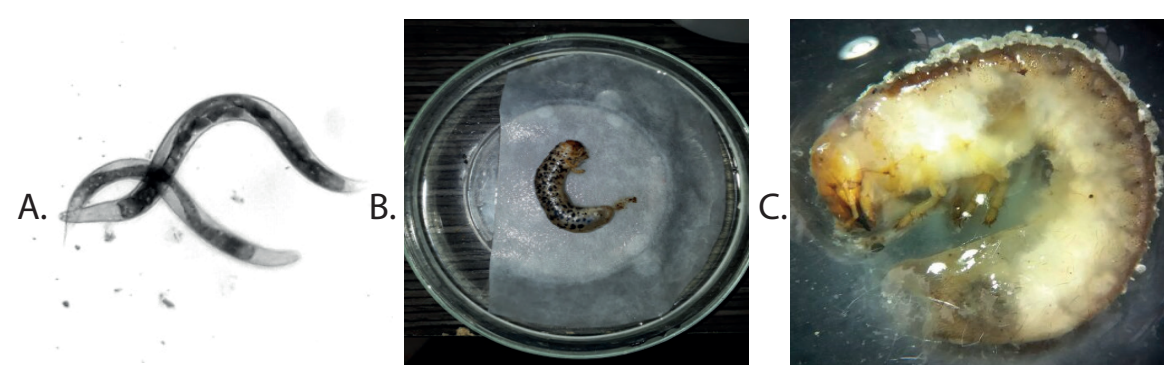


Figura 5. Pruebas de patogenicidad. A. NEP's; B. Trampa "White"; C. Afectación.

### CONCLUSIONES

Se logró establecer la cría in vivo de *Galleria mellonella* en condiciones de laboratorio, obteniéndose 2 generaciones del insecto con 7 estadios larvales, lo que evidencia una respuesta óptima de dicha plaga a la dieta y a la temperatura suministrada.

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian la patogenicidad de los géneros de NEP's *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre la plaga "Chiza o Mojoyoy", gracias a su capacidad de desarrollo, lo cual indica que estos organismos podrían emplearse como una herramienta adicional en el manejo integrado del artrópodo.

### RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se recomienda evaluar las dosis requeridas de los nematodos entomopatógenos que ocasionen mortalidad en el insecto.

### AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas por el financiamiento de la investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDDING, R.A. & AKHURST, R.J., 1975.- A simple technique for Soil, the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.
- BOEMARE, N.E., AKHURST, R.J. & MOURANT, R.G., 1993.- DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal to Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (18): 249-255.
- KAYA, H.K. & STOCK, S.P., 1997.- Techniques in insect nematology. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 1: 281-324.
- POINAR, G.O., 1979.- Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, Florida. 227p.
- THOMAS, G.M., & POINAR, G.O., 1979.- *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 29(4): 352-360.