

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)

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen especies de NEP's 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 NEP's 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 1A). Una hora después de la preparación se realizó la infestación con larvas del insecto (Figura 1B) y se introdujeron los recipientes en una incubadora Thermo Scientific a 25°C. Mensualmente se hizo renovación de la dieta.

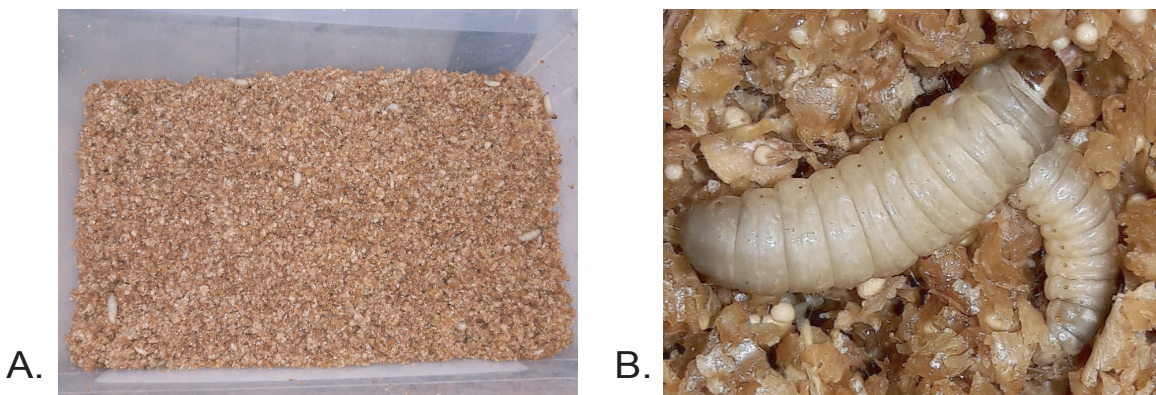


Figura 1. Cría de *G. mellonella*. A. Dieta artificial; B. Larvas de *G. mellonella* de último instar.

- 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 2A).

A partir del quinto día se inició la extracción de larvas de *G. mellonella* muertas y se ubicaron en cajas petri. Las larvas que presentaron síntomas por ataque de nematodos (POINAR, 1979) se sumergieron en hipoclorito de sodio al 0,05% por 1 minuto y se ubicaron en trampa "White" modificada por KAYA & STOCK (1997), con el fin de aislar NEP's (Figura 2B). 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 NEPs (Figura 2C). Las larvas infectadas permanecieron durante 9 días en las respectivas trampas mientras que los nematodos migraron al agua, utilizando agua lluvia para todos los procedimientos.

Cuatro días después de iniciar el proceso en la cámara white se observó la emergencia de juveniles infectivos (Figura 2D), a partir de ese momento se realizó una colecta diaria del agua contenida en las cámaras white con los nematodos entomopatógenos, reponiendo el volumen de agua extraído. Para efectos del almacenamiento de las muestras se dispuso de tubos Falcon estériles, debidamente identificados con un código de colecta. Se verificó la virulencia de los juveniles infectivos tomando una muestra de 1 ml y verificando el porcentaje de juveniles vivos con ayuda de un estereomicroscopio. Los tubos falcon con los correspondientes aislamientos fueron sometidos a refrigeración a una temperatura entre 7 y 8 °C y se realizó oxigenación cambiando el agua del recipiente cada 3 días eliminado el sobrenadante y reemplazando con un volumen equivalente al descartado, con el fin de garantizar la supervivencia de los NEP's.

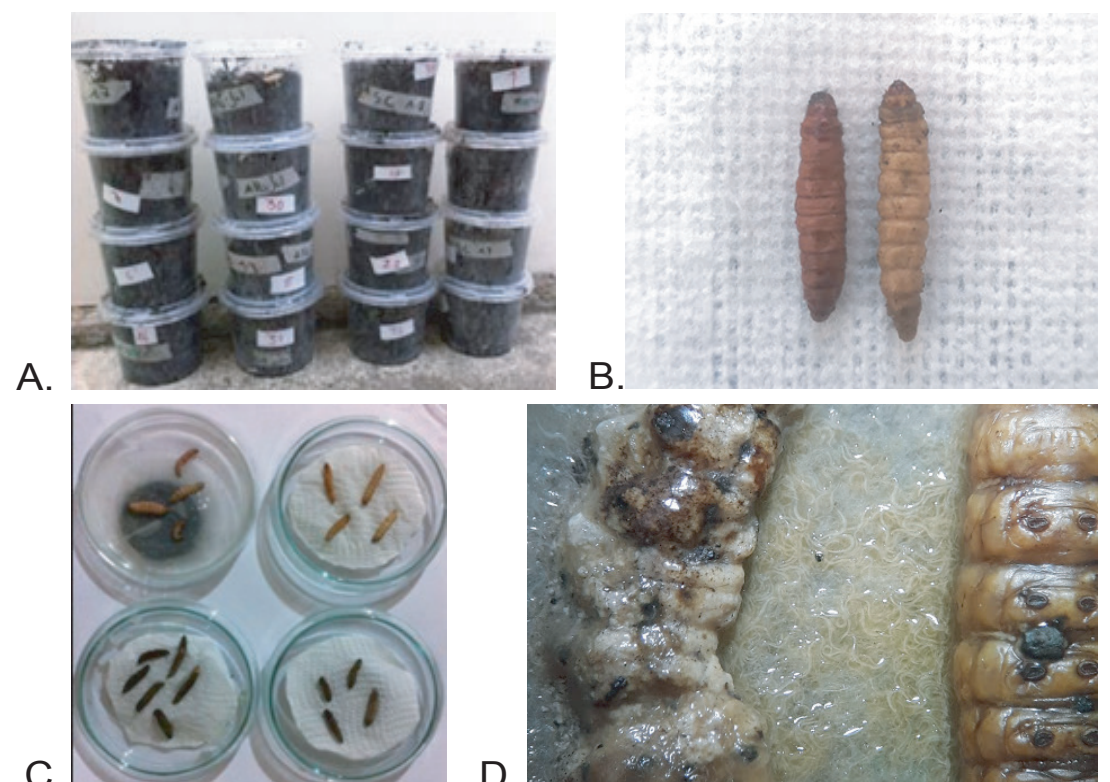


Figura 2. Búsqueda y aislamiento. A. Técnica "Insecto trampa"; B. Cuadro típico de infección; C. Larvas dispuestas en cámara White; D. NEP's

- 3) Pruebas de patogenicidad.

Se usaron larvas de *Aedes aegypti* suministradas por la Dirección Territorial de Salud de Caldas. Se utilizó un diseño completamente al azar con 8 repeticiones por tratamiento tomándose como unidad experimental cada larva de *A. aegypti* y realizando una réplica de este ensayo. Para efectos de la evaluación preliminar se utilizó una concentración alta de nematodos (5000 juveniles infectivos por larva) con inoculaciones llevadas a cabo por el método de inmersión. El tratamiento testigo consistió en los estados de desarrollo de la plaga inmersas en agua lluvia. Dada la alta movilidad que presentan los instar larvales de *A. aegypti*, el principal criterio para determinar la mortalidad del individuo fue la ausencia de movimiento observado bajo estereomicroscopio, luego de un suave lavado con agua destilada para remover nematodos externos, las larvas se colocaron en trampas white para verificar la reproducción exitosa del nematodo como indicador fehaciente de un proceso de parasitismo (Figura 3A y B).

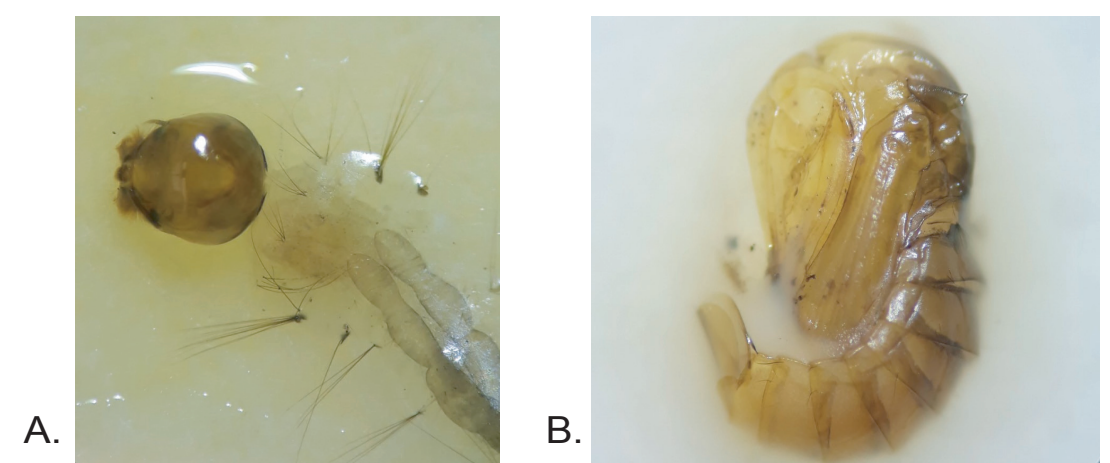


Figura 3. Pruebas de patogenicidad. A y B. *A. aegypti* afectada por NEP's.

RESULTADOS

-Los resultados de este trabajo evidenciaron que las poblaciones de *A. aegypti* son sensibles a diferentes cepas de NEP's en condiciones de laboratorio, en 85% de las muestras se pudieron aislar NEP's, de las cuales, el 75% correspondieron (de acuerdo la coloración típica de la larva) al género *Steinernema* y el 10% al género *Heterorhabditis*.

CONCLUSIONES

La susceptibilidad de los estados larvales de *A. aegypti* evidenciada en este trabajo indican que las cepas nativas de nematodos entomopatógenos podrían emplearse como una herramienta adicional en el manejo integrado de la plaga, ya que se observó claramente la patogenicidad y diferentes grados de virulencia de las especies utilizadas y la capacidad desarrollarse, cumpliendo su ciclo completo y multiplicándose en larvas infectadas, características deseables en controladores biológicos.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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.