

Busqueda de Nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae) en cultivos agrícolas

HUESO-Eva*†, FALLAD-Jalil, MANCILLA-Oscar y SEPULVEDA-José

Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Producción Agrícola, CUCSUR, Universidad de Guadalajara, Av. Independencia Nacional 151, Autlán, Jalisco 48900, Tel: (317) 38 25010 ext. 57139 y 57134. Fax: (317) 3823200

Recibido Enero 30, 2015; Aceptado Mayo 28, 2015

Resumen

Los problemas de contaminación ambiental causados por la aplicación de insecticidas químicos comúnmente utilizados en el control plagas insectiles lleva a la necesidad de alternativas al control químico. El presente estudio tuvo como objetivo establecer la existencia de poblaciones de nematodos entomopatógenos (NEP) nativos en los cultivos agrícolas de Autlán, Jalisco así como la identificación a nivel de género los aislados nativos y la determinación del grado de patogenicidad. Se recolectaron 50 muestras de suelo procedentes de los cultivos de la región. La recuperación de NEP se realizó mediante trampas cebadas con larvas de *Galleria mellonella* que resultaron ser susceptibles a la presencia de NEP. Se lograron 12 aislados de NEP nativos, distribuidos en los distintos cultivos. Los aislados pertenecen a los géneros *Steinernema spp.* y *Heterorhabditis spp.*, ocho aislados presentaron más de 90 % de patogenicidad contra larvas de *G. mellonella*.

Control biológico, patogenicidad, entomopatógenos.

Abstract

The environmental pollution problems caused by chemical insecticide application using on insect plague control is compelling us to the need of alternatives for the chemical control. The present study has as primary objectives to establish the existence of native entomopathogenic nematode populations (NEP) in Autlán, Jalisco agricultural soils, as well to the identification to genus level of native isolates, and its determine the degree of its pathogenicity. A total of 50 samples of soil were collected. The NEP recovery was performed by using traps baited with *Galleria mellonella* larvae were found to be very susceptible to the presence of NEP. 12 isolates native NEPs were achieved, distributed in the different crops. The isolates belong to the genders of *Steinernema spp.* and *Heterorhabditis spp.*, eight native isolates showed above 90 % of pathogenicity against larvae of *G. mellonella*.

Biological control, pathogenicity, entomopathogenic.

Citación: HUESO-Eva, FALLAD-Jalil, MANCILLA-Oscar y SEPULVEDA-José. Busqueda de Nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae) en cultivos agrícolas. Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales 2015, 1-1: 68-74

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: jhueso812@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El propósito de la agricultura en México es la obtención de una alta producción, libre de contaminantes químicos, de calidad y de bajo precio. Asimismo, busca el sustento y fomento del desarrollo industrial mediante la provisión de materia prima accesible a la cadena de producción, así como generar divisas mediante la exportación de productos de alto valor económico y la generación de empleos con ingresos dignos a la población sin dañar el medio ambiente.

Los efectos de contaminación ambiental originados por los insecticidas químicos comúnmente utilizados en el control plagas de maíz (*Zea mays*), caña (*Saccharum officinarum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicon* L.), chile (*Capsicum annum*), cilantro (*Coriandrum sativum*) y rábano (*Rhapanus sativus*), nos lleva a la búsqueda de alternativas al control químico de las plagas insectiles.

El manejo integrado de plagas es una alternativa viable incluyendo el uso del control biológico con la aplicación de microorganismos entomopatógenos. Entre estos se encuentran los hongos, virus, bacterias y los nematodos entomopatógenos (NEP). Estos últimos son considerados importantes como agentes de control biológico porque se caracterizan por presentar una acción de control rápida y ambientalmente segura, además de presentar un amplio rango de hospederos (Bedding y Miller, 1981; Simard y col., 2007).

Las larvas y pupas de insectos son muy susceptibles a la patogenicidad de especies del género *Steinernema*. Los estudios Kaya y Gaugler (1993) sugieren el uso de estos nematodos, ya que ejercen un efecto equivalente a la acción de un insecticida químico. El insecto parasitado por estos nematodos muere rápidamente en un lapso aproximado de 48 horas.

Otras cualidades de los NEP son el presentar la habilidad de buscar a su hospedero y su persistencia en el ambiente natural.

Los NEP son compatibles con insecticidas químicos y biológicos, además pueden ser multiplicados artificialmente a gran escala en medios líquidos o sólidos y ser almacenados por largos períodos en condiciones de refrigeración, además de poder ser aplicados por métodos convencionales en los cultivos. Finalmente, poseen la cualidad de ser seguros y no afectan plantas o vertebrados (Bedding y Miller, 1981; Kaya y Gaugler, 1993). Estos autores sugieren que los NEP steinernemátidos y heterorhabdítidos son efectivos contra varias especies de insectos plaga que se encuentran en hábitats críticos y suelo.

Wright y col. (1987) reportaron que la aplicación de NEP en el suelo antes de la llegada de las larvas y pupas del gorgojo de la papa roja disminuye la emergencia de adultos de esta plaga. Los NEP presentan un potencial en el control de insectos plaga especialmente a los Ordenes: Lepidoptera, Coleoptera y Diptera ya que pueden infestar y liquidar a un gran número de especies de insectos. Además, Simoes y Rosa (1996) observaron la existencia de una relación estrecha entre el nematodo y el insecto lo que sugiere una susceptibilidad específica del insecto que se refleja en una gran variabilidad que depende de la virulencia de la cepa o aislado. Los mismos autores anteriormente mencionados, reportan la diferencia de patrones de virulencia de una especie o cepa de nematodos contra un insecto en particular, cuando se compara esta con otras especies o cepas de NEP.

Estos resultados son una evidencia que pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios para identificar a aquellos nematodos nativos con potencial para el control biológico de una especie de insecto en particular.

Actualmente no se ha reportado estudios en Jalisco acerca de la existencia de NEP en estos cultivos (Hueso y col., 2005), por lo que el presente estudio contribuye a la generación de información científica. Particularmente con un diagnóstico de NEP nativos, aislamiento e identificación a nivel género utilizando los caracteres morfológicos (Stock y Kaya, 1996), así como estudios de patogenicidad, persistencia, producción para su aplicación en el control biológico de plagas endémicas.

Los objetivos del trabajo fueron coleccionar poblaciones de NE en los cultivos agrícolas de Autlán, identificar a nivel de género los aislados coleccionados y la determinar su grado de patogenicidad.

Materiales y métodos

Muestreo de suelo de campos

Se realizó una colecta de suelo en varias zonas del municipio de Autlán Jalisco, México durante los meses de Junio-Agosto 2013. Los puntos de muestreo se seleccionaron de acuerdo a los sistemas de producción: Caña, maíz, jitomate, chile, cilantro, rábano. En cada punto de muestreo se tomaron cinco sub-muestras a una profundidad de 10 a 15 cm, las cuales fueron colocadas y mezcladas en bolsas de plástico.

Cría de la polilla de la cera *Galleria mellonella*

Las larvas de *G. mellonella* fueron utilizadas como hospedero para aislar y multiplicar las poblaciones de aislados de NEP que pudieran encontrarse en las muestras de suelo y utilizadas en los experimentos. Las larvas del quinto estadio larval con una longitud aproximada de entre 1,5 y 2,0 cm, fueron utilizadas en diversas pruebas de laboratorio. Para la reproducción de los nematodos, se estableció un insectario de *G. mellonella* siguiendo la metodología propuesta por Woodring y Kaya (1988).

Aislamiento y Multiplicación de nematodos entomopatógenos

Las muestras coleccionadas de suelo se distribuyeron en cuatro botes de plástico de 1 L, para realizar el aislamiento de los NEP mediante la técnica de extracción propuesta por Bedding y Akhurst (1975) que consiste en la utilización de trampas-cebo con larvas de *Galleria mellonella*. Se colocaron 5 larvas sobre la superficie. Los recipientes se taparon y se incubaron a 20 °C por siete días. Las larvas de *G. mellonella* infectadas por el nematodo se distinguen de las sanas por su coloración, pudiendo mostrar un color rojo, crema o negro, según la especie del nematodo al que corresponda. Cada larva infectada por nematodos se lavó con agua destilada y se recuperaron los nematodos en trampas White Kaya y Stock (1997). La trampa consiste de una caja Petri de plástico 100 X 15 mm, la cual se llenó con 20 ml. de agua destilada y en cuyo interior se dispuso de otra placa Petri de 60 X 10 mm conteniendo un disco de papel filtro humedecido marca Whatman No. 1 (90 mm de diámetro).

Sobre el papel filtro de esta placa se colocaron las larvas de *G. mellonella* que presentaron sintomatología de afectación por nematodos y se incubaron a 20 °C por dos semanas (Woodring y Kaya, 1988).

El proceso de multiplicación se realizó colocando una suspensión de 200 IJ que se distribuyó equitativamente en una caja Petri con papel filtro sobre 10 larvas de *G. mellonella* de cada aislamiento. Las cajas se incubaron a 20 °C por una semana, posteriormente las larvas se colocaron en trampa White. Los nematodos que emergieron de la trampa se cosecharon por cuatro días, lavándolos tres veces con agua destilada. Después se almacenaron en matraces de tejido de cultivo de cuello inclinado con ventilación.

Determinación del grado de patogenicidad de las poblaciones encontradas

La prueba de patogenicidad se realizó según la metodología de Kaya y Stock (1997): en el caso de nematodos del género *Steinernema* se realizaron ensayos "One on one", para lo cual se inoculó un juvenil del nematodo (IJs) en una larva de *Galleria Mellonella* contenida en una celda de una placa (20 celdas), con papel filtro Whatman No 1 estéril. Para el caso de nematodos del género *Heterorhabditis spp*, se realizaron ensayos "Five on one" para lo cual se inocularon 5 IJs en una larva de *Galleria Mellonella* de quinto instar contenida en un tubo "ependorf" (1,5 ml de capacidad) con 0,5 ml de arena estéril (Kaya y Sotck, 1997). Posteriormente las cajas y los tubos se incubaron a 24 °C. El número de larvas muertas de *Galleria mellonella* se registraron a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de la inoculación. Para verificar la muerte de las larvas de gallería por acción de los nematodos, éstas se disectaron.

Análisis de datos

El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado sobre el porcentaje de mortalidad previa transformación angular del arcoseno $\sqrt{\%}$ para normalizar los datos (Sánchez y Rodríguez, 2008). Las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey al 0,05 de probabilidad.

Resultados y discusión

Muestreo y aislamiento de nematodos entomopatógenos

Se colectaron 50 muestras de suelo con 4 repeticiones, las cuales fueron procedentes de los cultivos de maíz, caña, chile, jitomate, cilantro y rábano. Las muestras de suelo fueron colocadas en trampas utilizando larvas de *Galleria mellonella* que resultaron ser muy susceptibles a la presencia de NEP. Se lograron aislar 12 aislados de NEP, distribuidos en correspondiente los distintos cultivos, seis aislados de jitomate, dos en chile, dos Cilantro, uno en maíz y uno en caña (Tabla 1). Se ha detectado presencia 8 nematodos entomopatógenos de las 50 muestras analizadas, lo que supone un porcentaje de abundancia del 16 % NEP en los diferentes tipos de suelo y sistemas de cultivo, este porcentaje es similar al reportado por Picoaga y col. (2007; 2008) en suelos de castaño en Galicia. No obstante, los porcentajes de distribución encontrados en el presente trabajo son inferiores a los 36,84 % observados en Buenaventura, Colombia por Méndez y col. (2011).

De acuerdo a Barbercheck (1992), la incidencia de NEP en el suelo no depende solamente de factores físicos como granulometría, textura, humedad, temperatura, aireación o pH del suelo; sino también por biológicos como la abundancia de insectos hospederos en el medio. Por su parte Ruiz y col. (2011), reportaron que la temperatura muestra un impacto negativo sobre la biología de los NEP que va desde su desarrollo, inhalación, perduración, localización de su presa e infectividad. En este sentido, Georgis y col. (2006) encontraron que la diferencias observadas, en relación a la temperatura, entre las dos especies de NEP, pueden ser debidas a que los juveniles de *H. bacteriophora* disminuyen su efectividad con temperaturas inferiores a 20 °C.

Esto es reflejado en los porcentajes de obtención de aislados de suelo oscilen entre niveles tan extremos de 0,7 % al 70,1 % (Mracek y Becvar, 2000). Estos resultados dan la pauta a continuar con la búsqueda de especies nativas de NEP para ser utilizados en el control de plagas endémicas de los cultivos habituales.

En lo que respecta a la identificación de los aislados, estos fueron identificados a nivel de género que de acuerdo a las características morfológicas que presentaron los cadáveres de *G. mellonella* extraídos de las “trampas” que después de ser enjuagadas se revisaron en el estereoscopio y mostraron un color café pálido, cuerpo blando y secreción aglutinante esto sugiere que pertenecen al género *Steinernema spp.* Los NEP que presentaron color rojizo ó marrón cuerpo blando y secreción aglutinante pertenecen al género *Heterorhabditis spp.* (Akhurts y Bedding, 1986; Stock y Kaya, 1996; Woodring y Kaya, 1988).

El análisis de las muestras de suelo colectadas en cada cultivo, todas se determinaron con una textura franco-arenoso con un potencial de hidrogeno alcalino lo que coincide con otros autores la actividad y supervivencia de los NE es menor en suelos arcillosos que en los franco-arenosos (Stuart y col., 2006, Sánchez y col., 2012), posiblemente debido a los bajos niveles de oxígeno en suelos con poros más pequeños como suelen ser los arcillosos (Hazir y col., 2004). Este es el primer reporte de la presencia de nematodos entomopatógenos en cultivos de hortalizas en el estado.

Prueba de patogenicidad

De los 12 aislados de nematodos entomopatógenos se realizó una evaluación de patogenicidad mediante la utilización de larvas de *G. mellonella* (Tabla 1). Se determinaron diferencias altamente significativas en patogenicidad entre los aislados obtenidos ($F_{47}= 45,49$ $P<0.000$).

Mediante la prueba Tukey se identificaron 8 aislados, los cuales presentaron mortalidades superiores al 90 % en 72 y 96 horas (Figura 1), entre ambos géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, siendo los más sobresalientes Sj 13 y Sj 07, con mortalidades de 98 y 95 % en 96 horas, respectivamente (Figura 1). La mayor parte de los aislados cinco correspondieron a sistemas de producción de jitomate, dos en chile, uno en caña. Estos resultados indican que estos nematodos entomopatógenos se encuentran asociados al cultivo de jitomate y chile.

De acuerdo a esto, los NEP que mejor resultaron de las pruebas correspondieron a los aislados de jitomate, evidenciando una mayor patogenicidad frente a larvas de *G. mellonella* que otros aislados, posiblemente debido a una mayor adaptabilidad de estos nematodos a medios adversos como los que se establecen en esta región, en donde los agricultores incorporan una amplia gama de pesticidas en sus cultivos; mostrando probablemente los nematodos compatibilidad con el sistema de manejo del cultivo de jitomate y otros cultivos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos comprueban la presencia de NEP. Además sugieren la necesidad de realizar más colectas en otros sitios de cultivo en la región, ya que el número de aislados nativos recuperados representan un 16 por ciento de abundancia. Lo anterior permitirá efectuar estudios de persistencia y patogenicidad contra las principales plagas que atacan los cultivos de interés económico, lo que hace a estos microorganismos entomopatógenos potenciales en el manejo de plagas agrícolas en la aplicación del control biológico. Así mismo la necesidad de realizar estudios de características físico-químicas de suelo con relación a la presencia de NEP.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología Jalisco (COECYT-JAL) y a la Universidad de Guadalajara por haber financiado el proyecto del cual se derivó esta información; a los beneficiarios del proyecto, por la logística y el apoyo brindado en la colecta del material y algunas especificaciones dadas sobre la zona de estudio.

Referencias

- Akhurst, R. J. and R. A. Bedding. 1986. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in soil in Australia. *Journal of Australian Entomology Society*. 25: 241-244.
- Barbercheck, M. E. 1992. Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. *Florida Entomology*. 75: 539-548.
- Bedding, R. A. and R. J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*. 21: 109-116.
- Bedding, R. A. and L. A. Miller. 1981. Disinfesting blackcurrant cuttings of *Synanthedon tipuliformis* using the insect parasitic nematode *Neoaplectana bibionis*. *Environmental Entomology*. 10:449-453.
- Georgis, R.; A. M. Koppenhöfer; L. A. Lacey, G. Belair, L. W. Duncan, P. S. Grewal, M. Samish, L. Tan, P. Torr and R.W.H.M. Van Tol. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*. 38: 103-123.
- Hazir, S.; H. Kaya, P. Stock, and N. Keskün. 2004. Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) For Biological Control Of Soil Pests. *Turkey Journal of Biology*. 27: 181-202.
- Hueso-Guerrero, E. J.; J. Molina-Ochoa, J. Fallad, R. Lezama-Gutiérrez, M. López-Edwards and J. Farías-Larios. 2005. Susceptibility of *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal larvae (Coleoptera: Curculionidae) to strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *HortScience*. 40(4):1025.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38:181-206.
- Kaya, H. K. and S. P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology: in: Manual of Techniques in insect pathology, L. A. Lacey (ed). *Biological Techniques Series*, (p. 281-324). San Diego, California: Academic Press.
- Marcek, Z. and S. Becvar. 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. *Nematology*. 2:297-301.
- Méndez-Barceló, A. A.; G. Oyala-Riascos y A. M. Caicedo-Vallejo. 2011. Aislamiento de nematodos entomopatógenos en áreas de Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Fitosanidad*. 15 (3): 153-157.
- Picoaga, A.; A. Abelleira y J. P. Mansilla. 2007. Primeros estudios de la diversidad y persistencia de nematodos entomopatógenos en suelos de castaño en Galicia. En: *II Congreso Iberico do Castanheiro*. Vila Real. Portugal. [En línea]. Disponible en: [http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/Comunicaciones/2007/nematodos\(SECF_palencia\).pdf](http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/Comunicaciones/2007/nematodos(SECF_palencia).pdf). Fecha de consulta: 23 de noviembre del 2013.
- Picoaga-Montoussé, A.; A. Abelleira-Argibay y J. P. Mansilla-Vázquez. 2008. Presencia de nematodos entomopatógenos en suelos de castaño en Galicia. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 26:39-43.

Ruiz-Vega, J.; F. Ruiz-Carballo, R. Pérez-Pacheco y S. H. Martínez-Tomas. 2011. Mejoramiento de la tolerancia al calor y a la desecación de tres nematodos entomopatógenos. *Nematropica*. 41(2): 264-270.

Sánchez, L. y M.G. Rodríguez. 2008. Potencialidades de *Heterorhabditis Bacteriophora* Poinar Cepa HC1 para El Manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. II. Compatibilidad con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Y Endosulfan. *Revista de Protección Vegetal*. 23(2): 104-111.

Sánchez-Saavedra, M.G.; H. Cortez-Madrigal y D. Cristobal-Acevedo. 2012. Inefectividad de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 18(3): 383-394.

Simoes, N. and J. S. Rosa. 1996. Pathogenicity and host specificity of Entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*. 6: 406-411.

Simard, L.; G. Belair, S. P. Stock, H. Mauleon and J. Dionne. 2007. Natural Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Nematidae: Steinernematidae) on Golf Courses in Eastern Canada. *Nematology*. 9(3): 325-332.

Stock, S. P. and H. K. Kaya. 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *Journal of Parasitology*. 82_(5): 806-813.

Stuart, R. J.; M. E. Barbercheck, P. S. Grewal, R. A. J. Taylor and C. W. Hoy. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biological Control*. 38:80-102.

Wright, R. J.; S. F. Agudelo, and R. Georgis. 1987. Soil applications of *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes for control of Colorado potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Nematol.* 19(2): 201-206.

Woodring, J. L. and H. K. Kaya. 1988. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* Nematodes: A Handbook of Techniques. (Pp.13-16): Fayetteville, Arkansas, E.U.A: Southern Cooperative Series Bulletin.

Anexos

Cultivo	Localidad	CODIGO	% Mortalidad	GÉNERO de NE
Jitomate	Camichin	Sj 03	92.5%	<i>Steinernema</i> sp.
	El Pozo	Sj 01	90.0%	<i>Steinernema</i> sp.
	Ayutita	Sj 07	95.0%	<i>Steinernema</i> sp.
	Palo seco	Sj 06	93.7%	<i>Steinernema</i> sp.
	La Parota	Sj 13	98.7%	<i>Steinernema</i> sp.
	La Sabinera	Sj 08	45.0%	<i>Steinernema</i> sp.
Chile	Bellavista	Hch 04	93.0%	<i>Heterorhabditis</i> sp.
	Casillas	Hch 01	90.0%	<i>Heterorhabditis</i> sp.
Cilantro	Chano	Sc 14 P	33.7%	<i>Steinernema</i> sp.
	Coajinque	Sc 08	50.0%	<i>Steinernema</i> sp.
Maiz	Martin	Sm 01	52.5%	<i>Steinernema</i> sp.
Caña	Chante	Sca 02	90.0%	<i>Steinernema</i> sp.
Rábano	Capulin	-	-	Sin presencia

Tabla 1 Mortalidad de larvas de *G. mellonella* mediante 12 aislados de nematodos entomopatógenos.

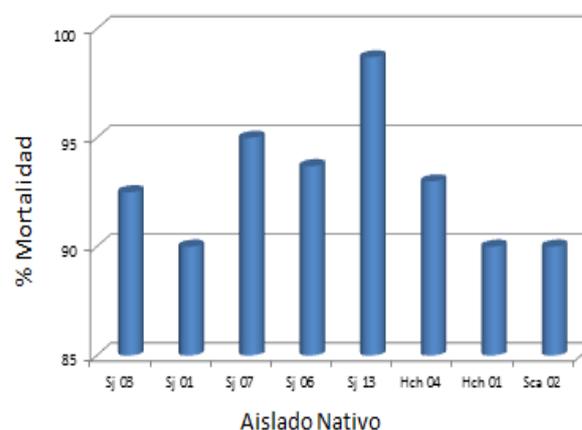


Gráfico 1 Prueba de patogenicidad con 8 aislados de NE sobre larvas de quinto estadio de *G. mellonella*.