

Búsqueda de poblaciones nativas de nematodos entomopatógenos en regiones de Colombia y Panamá

Elsa Liliana Melo-Molina¹, Carlos Alberto Ortega-Ojeda¹, Andreas Gaigl¹, Anthony C. Bellotti¹, Ralf-Udo Ehlers², Alper Susurluk²

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, AA 6713, Cali, Colombia,

elmelo@hotmail.com, caoro2003@yahoo.com, a.gaigl@cgiar.org, a.bellotti@cgiar.org

²Department of Biotechnology, Raisdorf, Christian-Albrechts-University Kiel, Alemania,

ehlers@biotec.uni-kiel.de, alper.susurluk@biotec.uni-kiel.de



Introducción

Los nemátodos entomopatógenos (NEP's) Heterorhabditidos y Steinernematidos son usados como agentes potenciales de control de numerosas plagas de suelo. A través del mundo se han llevado muchas investigaciones partiendo de capturas de poblaciones nativas de estos organismos y estudiando su distribución, encontrándose en variedad de habitats como: pastos, forestales, hortalizas, frutales, flores, etc., los cuales presentan diferentes características de suelos (Rueda *et al.*, 1993).

Una de las formas de captura de estos nematodos es por medio del insecto trampa *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), la cual presenta mas susceptibilidad ante estos patógenos que los insectos hospederos comunes. Este insecto provee una excelente detección de nematodos *in situ*, o para muestras procesadas en laboratorio (Bedding y Akhurst, 1975).

Objetivo

Identificar las especies nativas presentes en determinadas regiones de Colombia y Panamá, asociadas a cultivos atacados por insectos rizófagos, como aporte al conocimiento de estos enemigos naturales en el manejo biológico de plagas de suelo.

Material y Métodos

Se toman muestras de diferentes sitios de Colombia y Panamá (Figura 1), eligiendo suelos agrícolas con cultivos afectados con rizófagos. En el país se muestrean los departamentos Quindío, Risaralda, Caldas y Cauca; y, en Panamá las provincias Coclé, Veraguas, Chiriquí.

La toma de muestras de suelo se realiza al azar en el campo (Figura 2), con un barreno (4,5 cm de diámetro), a una profundidad entre 15 a 20 cm, extractando 1000 cm³ por submuestra, las que se conservan en termonevera con hielo (8 a 15 °C). Se identifica el sitio muestreado y se toman datos de localización, humedad relativa, temperatura, cultivos y fitófagos asociados; y, rotaciones efectuadas. Estas muestras se mantienen en laboratorio a 15 °C, en incubadora y en oscuridad.

Adicionalmente se toman muestras de suelo (500 g), para su análisis fisicoquímico.

El proceso para la búsqueda, reactivación y almacenamiento de NEP's en laboratorio se explica en la Figura 3.

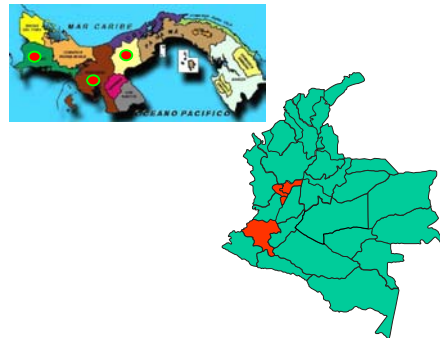


Figura 1. Sitios muestreados en Colombia (eje Cafetero y Cauca) y Panamá (Coclé, Veraguas y Chiriquí)

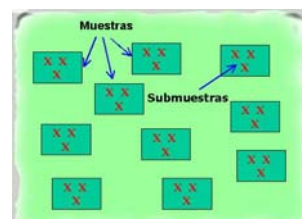


Figura 2. Esquemas para la toma de muestras en campo

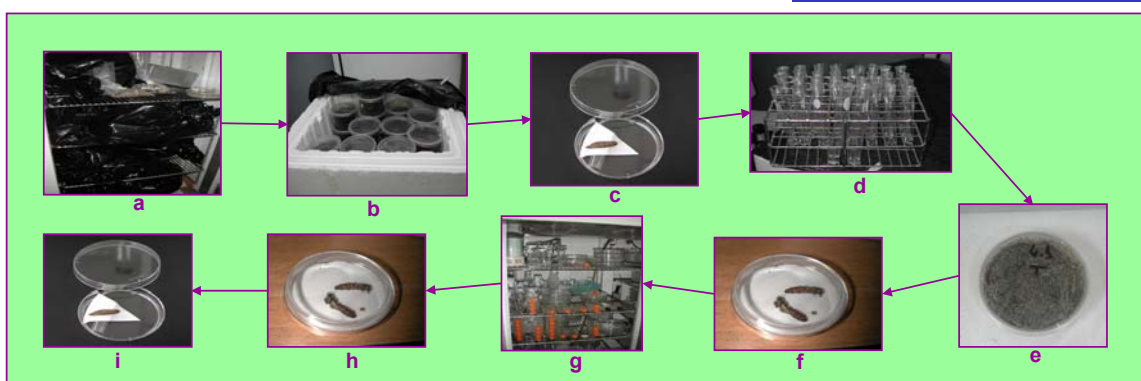


Figura 3. Extracción de NEP's en laboratorio (tres veces): a. suelos almacenados en incubadora; b. vasos plásticos con muestras; c. trampa *White* modificada; d. tubos con muestras de nematodos; e. cajas petri con arena con NEP's; f. larvas extraídas de la arena con síntomas; g. muestras almacenadas en incubadora; h. aplicación de postulados de Koch (reinfeción); i. recuperación de NEP's.

Resultados y Discusión

Los sitios se seleccionaron por encontrarse cultivos (cebolla, pastos, yuca y otros menos frecuentes como: Maracuyá, Mango, Árbol del pan) afectados por plagas rizófagas, en Colombia y Panamá.

En las muestras de Panamá, se identifican nematodos que por sus características morfológicas resultan ser saprófitos, estos se murieron en la solución de almacenamiento de formaldehído, imposibilitando su multiplicación por otros métodos. Las muestras de Colombia se procesan con la metodología propuesta, manteniéndose unas en solución fijadora TAF (Formol + Trietanolamina + agua destilada) y otras vivas en solución de formaldehído al 0.05 %. Todo este material es enviado a Alemania para su identificación por un especialista en técnicas moleculares.

Durante la evaluación se encontraron en las larvas de *G. mellonella* organismos que al parecer se estaban alimentando de ellas, identificando entre éstos a ácaros pertenecientes a las familias Acaridae e Histiomidae, que son conocidos por ser saprófagos y fungívoros.

También se observaron crecimientos de hongos, los cuales fueron identificados como *Fusarium* sp. y *Metarhizium* sp.

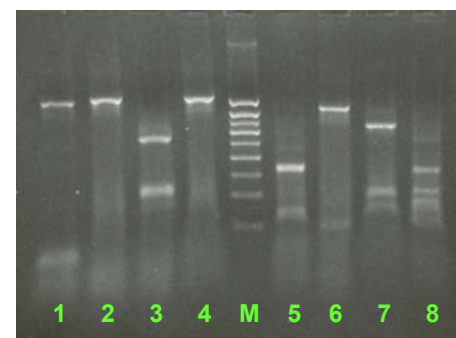
En casi todos los casos se encontraron nematodos sobre las larvas de *G. mellonella*. La separación entre saprófagos y patógenos se realizó aplicando los postulados de Koch, registrando síntomas en larvas así como comportamiento típicos. De las 320 muestras (300 g c/una) en 15 cultivos, se obtienen positivas para hongos (24), ácaros (16) y nematodos patógenos y saprófagos (21) (Tabla 1).

Tabla 1. Sitos de muestreo de NEP's en Colombia y Panamá y los organismos aislados.

País	Departamento o Provincia	Municipio	Cultivo	No. de muestras	Organismo presente		
					Ácaro	Hongo	Nematodo
Panamá	Coclé	El Valle de Antón	Cebolla	5	2	2	1
			Maní	5	0	2	1
	Veraguas	Ocú	Yuca	10	0	2	1
			Yuca	6	0	2	0
	Chiriquí	Cerro Punta	Cebolla	5	1	2	1
Colombia	Quindío	Quimbaya	Cebolla	21	1	2	1
			Plátano	20	1	2	1
			Maíz	20	0	1	1
	Risaralda	Santa Rosa	Cebolla	5	0	1	0
			Pasto	38	1	1	1
			Yuca	33	0	1	1
		La Florida	Cebolla	24	1	0	1
			Pasto	35	1	0	1
	Caldas	Manizales	Guamo	3	0	1	1*
			Árbol del Pan	3	0	0	1
			Maíz	3	0	0	1
			Frijol	3	1	0	1
			Yuca	4	1	0	1
			Aguacate	2	0	0	0
			Plátano	2	0	0	0
			Mango	2	1	0	0
			Mandarina	2	1	1	0
			Limón	3	1	0	0
			Maracuyá	3	0	1	0
			Café	4	0	1	1
Cebolla	6	0	1	1			
Cauca	Santander de Quilichao	Pasto	20	1	0	1	
		Yuca	31	1	1	1*	
		Maní	2	1	0	1	
TOTAL				320	16	24	21 (6,6%)

* Muestras positivas para entomonematodos, con la especie *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923)

De esta búsqueda (20 muestras aparentemente patógenas), se reporta por primera vez en Colombia, en Cauca (Yuca) y Caldas (Guamo), la especie *Steinernema kraussei*, descrita por Steiner (1923). La identificación la realiza Susurluk (2004) con la técnica molecular de PCR (Figura 4).



- Dde I *Desulfovibrio desulfuricans*, strain Norway
- Hae III *Haemophilus aegyptius*
- Hha I *Haemophilus haemolyticus*
- Hind III *Haemophilus influenzae* Rd
- M. Marcadores de peso molecular de las bandas (1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pares de bases)
- Hinf I *Haemophilus influenzae* Rf
- Hpa II *Haemophilus aphrophilus*
- Rsa I (Afa I) *Acidiphilium facilis*
- Sau 3 AI. *Staphylococcus aureus* 3A

Figura 4. PCR de *Steinernema kraussei* de productos de la region ITS digerida con ocho enzimas de restricción:

Según el análisis de suelo de estas regiones, donde se identificó la especie, presentan un pH entre 6,4 (Cauca) y 5,2 (Caldas), con una textura entre franco-arcillosa y franco-arcillosa-limoso, respectivamente.

Conclusiones y Recomendaciones

Se colecta e identifica por primera vez en Colombia *Steinernema kraussei*, especie reportada en otros países como controladora de chisas.

Según algunos autores los suelos de textura franco-arcillosas presentan menos ocurrencia de NEP's (Parada, 2001), sin embargo, en este caso en uno de los sitios evaluados con esta textura se hallaron NEP's, mostrando esta especie un amplio rango. Los steinernematidos se hallaron dentro del rango de pH de 4 a 8 que reportan Koppenhofer *et al.* (1996).

Del total de las muestras evaluadas (320) solo el 6,6% presentan nematodos, lo que puede deberse a que el muestreo se realizó en suelos de cultivos bajo manejo químico (cultivados), lo que podría influenciar la presencia de estos organismos, por lo que es recomendable muestrear paralelamente sitios sin intervención química.

De las 20 muestras de nematodos enviadas a Alemania para su identificación, dos fueron positivas como entomopatógenos (*S. kraussei*), continuándose la identificación de las restantes.

Referencias

- Rueda, L.M., Osawaru, S.; Georgi, L.; Harrison, R. E. 1993. Natural Occurrence of Entomogenous Nematodes in Tennessee Nursery Solis. *Journal of Nematology* 25 (2): 181-188.
- Bedding, R.A.; Akhurst, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.
- Koppenhofer, A.; Kaya, H. 1996. Coexistence of entomopathogenic nematode species (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) with foraging behavior. *Fundam. Apple Nematology*. 19 (2): 175-183.
- Parada, J.C. 2001. Aislamiento e identificación de nematodos entomoparásitos. En: Seminario de nematodos entomoparásitos una alternativa en MIP: "Especies, Biología, Ecología, multiplicación masiva, Técnicas de aplicación, experiencias y perspectivas de uso". Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Agosto 24. p. 7-14.