

NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS EN TERRENOS DE CULTIVO DEL DISTRITO DE MONSEFÚ Y MOTUPE DE LA REGIÓN LAMBAYEQUE

NOMATODOS ENTOMOPATÓGENOS ISOLATED IN GROUNDS OF CULTIVATION OF THE DISTRICT OF MONSEFÚ AND MOTUPE OF THE LAMBAYEQUE REGION

Denis Marx Pacheco Chinchay¹
Carmen Patricia Calderon Arias²
Darwin Pérez Tesen³



Fecha de recepción : 02 mayo 2018
Fecha de aceptación : 18 noviembre 2018
DOI : <https://doi.org/10.26495/rtzh1810.428438>

Resumen

*Se colectaron muestras de tierra de diferentes cultivos de maíz del distrito de Monsefú y cultivos de mango del distrito de Motupe, aislándose dos cepas una M2 del distrito de Monsefú y otra MH del distrito de Motupe, ambas fueron recuperadas y multiplicadas en larvas de *Gallería melonella*, conservándose a temperatura ambiente en el laboratorio de control biológico de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo - Lambayeque.*

Palabras clave: *aislamiento, nematodos entomopatógenos*

Abstract

*Soil samples from different maize crops and mango crops were collected from the Monsefu district, isolating two strains. One M2 from the Monsefu district and another MH from Motupe district, both were recovered and multiplied in larvae of *Galleria melonella*, kept at room temperature in the biological control laboratory at Pedro Ruiz Gallo National University, Lambayeque.*

1 Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú, marxdpach@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-9277-1635>

2 Doctora en ciencias ambientales, Docente de la Universidad Señor de Sipán, Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú, carmenca_2@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-1450-0594>

3 Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú, dar63@yahoo.com.

Keywords: *isolation, entomopathogenic nematodes*

1. Introducción

Los nematodos parásitos han sido conocidos desde el siglo XVII, Ncikle y Welch, (1984), el primer reporte de nematodo entomopatógenos fue por Steiner como *Aplectana kraussei* (ahora *Steinernema kraussei*) en 1923 deo de ser más que una curiosidad debido a la problemática de la clasificación (Steiner,1923). Luego los utilizaron para el control de insectos plaga (Glaser y Fox, 1930).

Posteriormente Poinar y Thomas (1965) describieron la asociación de la bacteria y el nematodo *S. carpocapsae* dándole el nombre de *Achromobacter nematophilus* debido a su gran tamaño su capacidad para licuar la gelatina y su acción sobre leche tornasol y *nematophilus* porque en medio Tergitol-6 las colonias son de color colonias azules sobre un fondo azul claro. Con microscopia electrónica se demostró que los nematodos juveniles infectivos contenían esta bacteria y por lo tanto sería la responsable de causar la muerte, probablemente por la producción de enzimas proteolíticas cuando la bacteria se introduce en la hemolinfa de la larva del insecto (Poinar y Leutenegger, 1968; Poinar y Thomas, 1967), el género *Heterorhabditis* fue descrito por Poinar en una larva de polilla nocturna (*Heliothis punctigera* Hall) en Brecon al sur de Australia (Poinar, 1976).

La diferencia entre los juveniles infectivos de *Neoaplectana* y *Heterorhabditis* es por la posición del poro extretor con relación al anillo del nervio, el poro es posterior al anillo de nervio en *Heterorhabditis* y anterior en *Neoaplectana*, *Heterorhabditis* posee gancho en la punta de la cabeza, *Neoaplectana* carece de gancho, los *Steinernematidos* masculinos carecían de una bursa caudal apoyada por la papila, estructuras que se encuentran con todo machos heterorhabdítidos (Poinar, 1986; Wright,1990), el gancho en la punta de la cabeza permite que los infectivos entren en la cavidad del cuerpo a través del tegumento exterior (Poinar y Georgis, 1990).

El dauer de *Heterorhabditis* puede convertirse en hembras hermafroditas (espermatozoides está presente en el útero de las hembras recién formados) mientras que el dauer de *Steinernema* se convierte en machos o hembras, y el apareamiento es necesario para la reproducción (Poinar, 1976).

Nematodos entomopatógenos poseen muchos atributos como ser excelentes controladores biológicos de diferentes plagas, sustituyendo a muchos productos químicos (Kaya y Gaugler, 1993) y sin duda su producción comercial seguirá aumentando como por ejemplo *Heterorhabditis bacteriophora* está disponible como Otinem en Estados Unidos y *H. megidis* como *Nemasys* en el Reino Unido (Smart, 1995).

2. Material y métodos

El trabajo de investigación se realizó en los meses de diciembre del 2015 a mayo del 2016 para el aislamiento de los nematodos entomopatógenos se realizó la crianza de *G. mellonella* "polilla de la cera" en el laboratorio de control biológico de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo - Lambayeque, con el propósito de disponer de larvas para el aislamiento y multiplicación de los nematodos entomopatógenos, se

utilizó la técnica de producción en masa de Dutky, Thompson y Cantwell (1962) modificada (figura 1).

En una investigación anterior se había informado de la presencia de nematodos entomopatógenos nativos en la región Lambayeque distrito de Reque (Córdova y Pérez, 2010). para el aislamiento de nematodos entomopatógenos se utilizó la técnica de Bedding y Akhurst (1975) modificada conocida como insecto trampa, que consiste en colocar cinco larvas de *G. mellonella* como cebo en contenedores que contengan tierra.

Para la obtención de las muestras del terreno de cultivo se utilizó un trozo de tubo plástico de cuatro pulgadas de diámetro y 15 a 20 centímetros de alto, estas muestras de diferentes cultivos del distrito de Monsefú a 6° 52' 40" S - 79° 52' 18" O y del distrito de Motupe 06° 09' 03" latitud Sur y 79° 42' 51" longitud Oeste, fueron colocadas en tapers plásticos nuevos, sellados y rotulados con la identificación correspondiente, luego se le agrego las larvas de *G. mellonella* y se selló para que no se salgan, pasado unos cinco días se evaluó cuál de las larvas mostraban signos de: apariencia flácida, cambio de coloración café o rojo ladrillo, purpura o naranja, estas características indicaban que ya están parasitadas por nematodos entomopatógenos (Bedding y Akhurst, 1975) y las que no presentaron signos de parasitación fueron regresadas al taper, para ser evaluadas posteriormente. (Figura 2)

Las larvas con signos de parasitación se colocaron en cámara White para la recuperación de los nematodos entomopatógenos (White, 1927) (Figura 3). Para la multiplicación de los nematodos entomopatógenos M2 y MH se siguió la metodología de Kaya (1990) con algunas modificaciones. En un taper de plástico provisto de papel absorbente se agregó 50 larvas *G. mellonella* de ultimo estadio, se inoculó la solución de nematodos en una proporción de 20 nematodos/ larva, se cubrió con papel absorbente, luego el taper fue tapado para conservar la humedad; se incubó por una semana de 20-28 °C y 85% de humedad relativa, pasado cuatro días se observó que las larvas de *G. mellonella* habían muerto, estas fueron sacadas del taper y colocaron en trampas White conteniendo agua destilada a temperatura ambiente hasta que emerjan los juveniles infectivos. Los nematodos se cosecharon diariamente por siete días consecutivos (Kaya y Stock, 1997).

La cuantificación se realizó por conteo directo al estereoscopio, por dilución o estimación volumétrica (Woodring y Kaya, 1988). En una micropipeta de 10 ul se colocó una solución inicial de nematodos, esta solución se agregó en una placa Petri (5cm de diámetro) rayada y dividida en transeptos de un centímetro, posteriormente se realizó el conteo directo al estereoscopio (Figura 4).

Crianza de *G. mellonella*.



Figura 1. Crianza de *G. mellonella*. (A) taper con adultos de *G. mellonella* para la Producción de huevecillos. (B) taper con polen y huevecillos. (C) larvas de ultimo estadio con dieta a base de ricocan, salvado de trigo y miel de abeja.

Crianza de *G. mellonella*.



Figura 2. Aislamiento de nematos entomopatógenos nativos (A) recolección de muestras de tierra en cultivo de maíz Distrito de Monsefú, (B) recolección de muestras de tierra en cultivo de mango distrito de Motupe, (C) tapers con tierra y larvas de *G. mellonella*, (D) larvas de *G. mellonella* mostrando signos de parasitación.

Recuperación de nematodos entomopatógenos

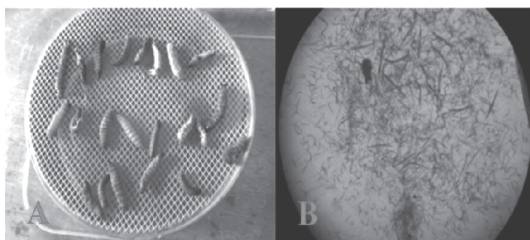


Figura 3. Recuperación de nematodos entomopatógenos (A) nematodos entomopatógenos en cámara White, (B) observación al estereoscopio de nematodos entomopatógenos después de la recuperación.

Nematodos entomopatógenos

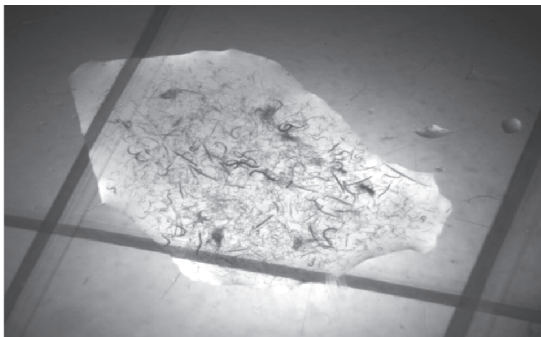


Figura 4. Cuantificación de nematodos entomopatógenos en placa rayada y dividida en transeptos de 1 cm.

3. Resultados

Se aisló una gran cantidad de nematodos entomopatógenos de los agroecosistemas de la región Lambayeque; la cepa aislada del cultivo de maíz del distrito de Monsefú, se la denominó M2 debido que la muestra número 2 fue la que se recuperó en las larvas de *G. melonella* y la cepa que se aisló del cultivo de mango del distrito de Motupe se la designó MH, la multiplicación se realizó en larvas de *G. mellonella* de último estadio [Figura 5].

Nematodos entomopatógenos

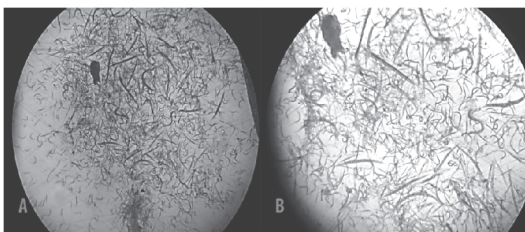


Figura 5. Nematodos entomopatógenos recuperados vistos al estereoscopio. (A) cepa M2 visto al estereoscopio con presencia de nematos de diferente tamaño. (B) cepa MH visto al estereoscopio. con presencia de nematos de diferente tamaño.

4. Discusión

En el presente estudio se aislaron dos cepas de nematodos entomopatógenos nativos del distrito de Monsefú (M2) y del distrito de Motupe (MH) de la región Lambayeque por sus características morfológicas y de comportamiento se dedujo que probablemente son del género *Steinernema*, estas características son descritas por

Poinar [1986], Wright [1990], (Poinar y Georgis, 1990), (Poinar, 1976) El género *Steinernema* comprende un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto (machos y hembras) de diferentes tamaños y juveniles más pequeños observados al estereoscopio, el tercer estadio juvenil es el infectivo, llamado en ocasiones "larvas dauer", al diseccionar las larvas de *G. mellonella* se observó una primera generación de adultos "gigantes".

Para el género *Heterorhabditis* los juveniles de la primera generación llegan a ser hermafroditas y en la segunda generación se desarrollan machos y hembras. Con microscopía electrónica la diferencia entre los juveniles infectivos de *Steinernema* y *Heterorhabditis* es por la posición del poro excretor con relación al anillo del nervio, el poro es posterior al anillo de nervio en *Heterorhabditis* y anterior en *Steinernema*, *Heterorhabditis* posee gancho en la punta de la cabeza, *Steinernema* carece de gancho, los *Steinernematidos* masculinos carecen de una bursa caudal apoyada por la papila, estructuras que se encuentran con todos machos *Heterorhabditidos*.

Stock, Pryor y Kaya [1999]. Muestreo diferentes hábitats de California encontrando un 80 % de steinernematidos y un 20 % de *Heterorhabditis*. Hazir, Keskin, Stock, Kaya y Oscan [2003] muestrearon 7 regiones geográficas de Turquía de todos los nematodos entomopatógenos aislados 15 fueron steinernematidos y siete fueron heterorhabditidos, estos resultados indica que el género *Steinernema* está más distribuido en la tierra y está mejor adaptado que el género *Heterorhabditis*, en el muestreo que se realizó en el distrito de Monsefú y el distrito de Motupe los nematodos aislados son probablemente del género *Steinernema*. Kaya et al [2006] menciona que es recomendable utilizar especies indígenas o nativas para una zona determinada para combatir las plagas. Kaya y Reardon [1982] avances realizados en el comportamiento de nematodos y ecología demuestran claramente que son patógenos no generalistas sino más bien específicos.

Actualmente existen técnicas moleculares del ADN que son más rápidas y fiables para identificar, caracterizar poblaciones de nematodos hasta la subespecie (Curran, Baillie y Webster, 1985; Curran y Webster, 1987).

5. Conclusiones

- Se aislaron dos cepas de nematodos enteropatógenos de los agroecosistemas de la región Lambayeque.
- La cepa M2 fue aislada de cultivo de maíz del distrito de Monsefú y la cepa MH en cultivo de mango del distrito de Motupe.
- Permitió conocer que en la región Lambayeque existen especies nuevas de nematodos enteropatógenos.
- Estas nuevas cepas pueden ser muy útiles para el control de plagas agrícolas, debido que las plagas agrícolas no generan resistencia con este tipo de control.

6. Referencias

- Bedding, R. y Akhurst, R. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21(1), 109-110.
- Córdova, O. y Pérez, E. (2010). *Potencial biocontrolador de nematodos entomopatógenos nativos (Rhabditis) sobre Agrotis sp (Lepidoptera: Noctuidae) en laboratorio*. Tesis para optar el título de licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo: Lambayeque, Perú.
- Curran, J. y Webster, J. (1987). Identification of nematodes using restriction fragment length differences and species-specific DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9(2), 162 - 166.
- Curran, J., Baillie, D. y Webster, M. (1985). Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. *Parasitology*, 90(1), 137 - 144.
- Dutky, S., Thompson, J. y Cantwell, G. (1962). A technique for mass rearing the greater wax moth. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 64(1), 56-58.
- Glaser, R. y Fox, H. (1930). A nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Science*, 71(1827), 16 - 17.
- Kaya, H. (1990). Entomopathogenic nematodes in biological control of insects. En *New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan R. Liss, Inc.; (págs. 189-198).
- Kaya, H., Aguilera, M., Alumai, A., Choo, H., De la Torre, M., Fodor, A., . . . Ehlers, R. (2006). Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38(1), 134 - 155.
- Kaya, H. y Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 181 - 206.
- Kaya, H. y Reardon, R. (1982). Evaluation of *Neoaplectana carpocapsea* for biological control of the Western Spruce Budworm, *Choristoneura occidentalis*: Ineffectiveness and persistence of tank mixes. *Journal of Nematology*, 14(4), 595 - 597.
- Kaya, H. y Stock, P. (1997). Techniques in insect nematology. En L. Lacey, *Manual of Techniques in Insect Pathology* (págs. 281-324). London: Academic Press.
- Nickle, R. y Welch, H. (1984). History, development, and importance of insect nematology. En R. Nickle, *Plant and insect nematodes* (págs. 627 - 653). New York: Marcel Dekker.
- Poinar, G. (1976). Description and Biology of a New Insect Parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis Bacteriophora* N. Gen., N. Sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). *Nematologica*, 21(4), 463-470.

- Poinar, G. (1986). Recognition of *Neoaplectana* Species (Steinernematidae: Rhabditida). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53(1), 121 - 129.
- Poinar, G. y Georgis, R. (1990). Characterization and field application *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 (Heterorhabditidae : Rhabditida). *Revue de Nématologie*, 13(4), 387-393.
- Poinar, G. y Leutenegger, R. (1968). Anatomy of the infective and normal third-stage juveniles of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Nematoda). *The Journal of Parasitology*, 54(2), 340 - 350.
- Poinar, G. y Thomas, G. (1965). A new bacterium, *Achromobacter Nematophilus* sp. nov. (Achromobacteriaceae Eubacteriales) associated with a nematode. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 15(4), 249 - 252.
- Poinar, G. y Thomas, G. (1967). The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(4), 510 - 514.
- Smart, G. (1995). Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27(4S), 529 - 534.
- Steiner, G. (1923). *Aplectana krausei* n. sp., einer in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen nematoden. *Zentralblatt fuer Bakteriologie. (1. 18, Ed.) Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 59.
- Stock, P., Pryor, B. y Kaya, H. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation*, 8(4), 535-549.
- White, G. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66(1709), 302-303.
- Wright, P. (1990). Morphological characterisation of the entomogenous nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Rhabditida). *New Zealand Journal of Zoology*, 17(4), 577 - 585.