

Laboratorio de Nematología, Centro de Zoología Aplicada. Universidad Nacional de Córdoba,
Casilla de Correo 122. 5000 Córdoba, Argentina

EFICIENCIA DE LA TÉCNICA RÁPIDA PARA DETECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS (STEINERNEMATIDAE Y HETERORHABDITIDAE) EN SUELO

por

M. M. A. DE DOUCET, A. L. GIAYETTO y M. A. BERTOLOTTI

Resumen. Suelo contaminado con dosis conocidas de juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* y/o *Steinernema glaseri* fue tratado mediante la técnica rápida para determinar cuántos nematodos se recuperan del suelo cuando una única especie está presente y si permite detectar más de una especie. Los nematodos se recuperaron de los insectos parasitados por disección manual o digestión enzimática. La técnica mencionada permite detectar todos los juveniles infectivos activos cuando hay una única especie, poner en evidencia dos especies en una misma muestra y obtener los resultados en 48 horas.

Summary. Efficiency of the rapid technique to detect entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in soil. The efficiency of the rapid technique was evaluated to determine how many nematodes can be recovered when a single species is present in the soil and whether it permits the detection of more than one species. The soil was artificially infested with infective juveniles belonging to *Heterorhabditis bacteriophora* and/or *Steinernema glaseri*. The nematodes were recovered and quantified by manual dissection or enzymatic digestion. The use of the technique allows the detection of all the active infective juveniles when a single species is present, and indicates the presence of two species in the same sample with the results obtained within 48 hours.

Técnicas apropiadas para la detección y cuantificación de juveniles infectivos (JI) de una o más especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) a partir de una muestra de suelo, son imprescindibles para emprender estudios de biodiversidad y evaluar persistencia en un ecosistema (Hominick y Reid, 1990, Bednarek y Nowicki, 1991; Fan y Hominick, 1991).

Las técnicas que se utilizan para la detección son indirectas y se basan en el empleo de huéspedes auxiliares, *insectos trampa* susceptibles

de ser parasitados por los juveniles infectivos (JI) que se encuentran en el suelo.

Entre esas técnicas se destacan la "trampa con *Galleria*" (Bedding y Akhurst, 1975) y la "técnica rápida" (Doucet, 1986). En la primera se trabaja *in situ* o trasladando el suelo al laboratorio (Bedding y Akhurst, 1975); en la segunda, se procesan las muestras de suelo para extraer y concentrar los nematodos presentes en ellas (Doucet, 1986).

La recuperación y cuantificación de los JI presentes en el suelo se estima a partir de los que

penetraron en el insecto trampa. Esto puede realizarse mediante disección manual (Poinar, 1975) o digestión enzimática (Mauleon *et al.*, 1993).

Las ventajas operativas de la utilización de la técnica rápida ya fueron señaladas (Doucet, 1986). No obstante, se desconoce cuántos nematodos se recuperan cuando una única especie se encuentra en el suelo y qué sucede cuando se encuentran dos especies. Si se tiene en cuenta que entre los nematodos entomopatógenos puede establecerse una relación de exclusión competitiva (Allatorre Rosas y Kaya, 1990; Koppenhöfer y Kaya, 1996), evaluar estos aspectos es de particular interés.

Materiales y métodos

Los nematodos utilizados fueron *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Heterorhabditidae) aislado en Córdoba, Argentina y *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Steinernematidae) procedente de Cataluña, España.

Los JI se obtuvieron de cultivos puros mantenidos en el Centro de Zoología Aplicada y se utilizaron los que habían emergido de insectos entre un mes y quince días antes de la experiencia.

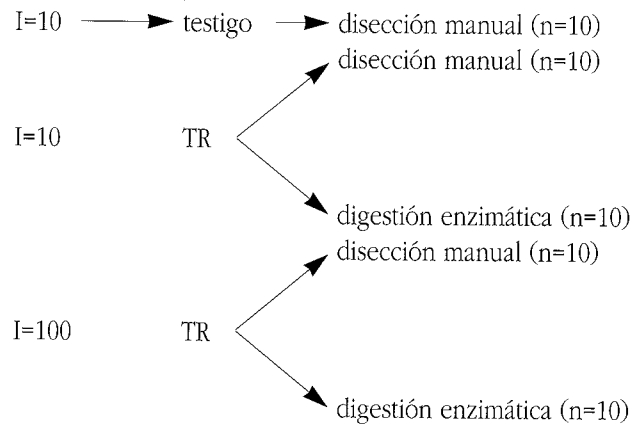
Se acondicionaron 40 cajas plásticas, cada una con 100 g de suelo esterilizado. A veinte cajas se les agregó el inóculo 10 JI (I=10) de *H. bacteriophora*; y a las restantes 100 JI (I=100) de *H. bacteriophora* y *S. glaseri* (50+50).

El suelo de cada caja plástica se procesó mediante técnica rápida (TR) y el resultado se acondicionó individualmente en cajas de Petri provistas de cinco larvas de *Galleria mellonella* L.

El testigo consistió en colocar diez JI de *H. bacteriophora* sobre papel de filtro, en diez cajas de Petri.

Cinco días después se recuperaron y cuantificaron los nematodos que habían ingresado mediante disección manual y digestión enzimática, en diez cajas en cada caso.

Se definieron entonces los tratamientos:



Los resultados obtenidos en cada tratamiento se compararon mediante análisis de varianza de clasificación simple ($P < 0.01$) (Sokal y Rohlf, 1980).

Resultados

Los porcentajes de JI recuperados se resumen en las Fig. 1 a y b.

Para I=10, en todos los casos, el análisis de varianza demuestra que no existen diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos (Fig. 1, a). Asimismo en I=100 no se encontraron diferencias entre los dos métodos de recuperación (Fig. 1, b).

Comparando los resultados obtenidos, cuando se colocan pocos individuos en la muestra y dos especies actuando conjuntamente (I=10 *vs.* I=100) las diferencias son significativas recuperando de cada caso 11-17% y 5,1-5,6% respectivamente.

En las cajas con I=100, se recuperaron las dos especies de nematodos y los porcentajes de recuperación fueron inferiores al 10% (disección manual = 5.1%; digestión enzimática = 5.6%). El total recuperado por especie fue: *S. glaseri* disección manual = 7.8%; digestión enzimática = 4.2%; *H. bacteriophora*: disección manual = 3.6%; digestión enzimática = 7%.

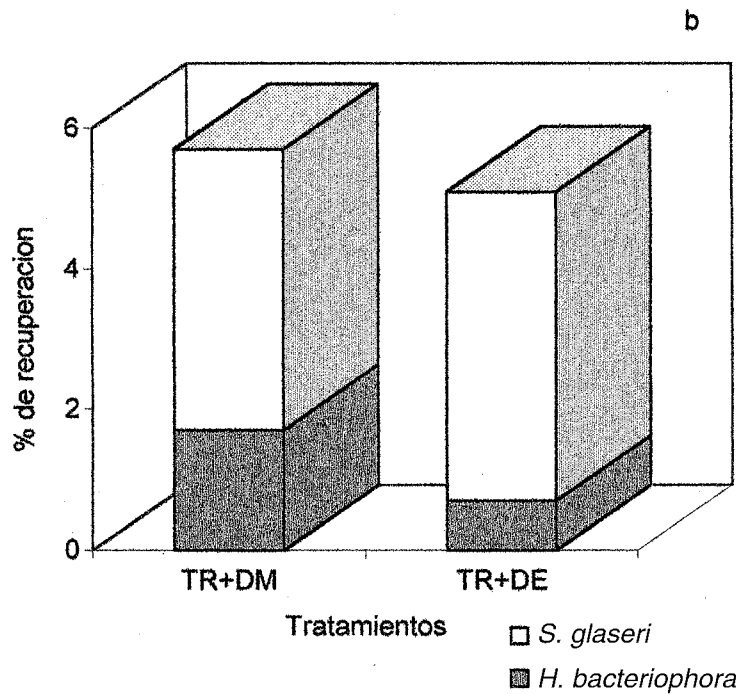
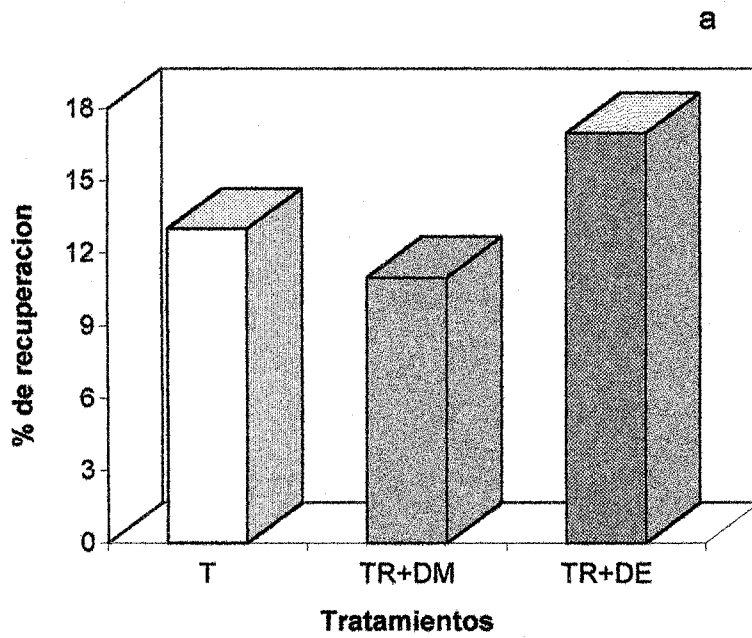


Fig. 1 - Recuperación (en porcentajes) de nematodos entomopatógenos presentes en muestras de suelo, procesadas según "técnica rápida" y disección manual (TR+DM) o digestión enzimática (TR+DE); a, suelo con sólo una especie de nematodo y testigo (T); b, suelo con dos especies de nematodos.

El número de huéspedes parasitados por *S. glaseri* fue el doble que por *H. bacteriophora* (42% vs. 20%). Ambas especies pudieron recuperarse conjuntamente del 60% de las cajas. Ningún insecto fue parasitado por los dos nematodos a la vez y en tres casos se recuperó sólo una especie.

Discusión

Cuando se trata de aplicar una técnica al estudio de nematodos entomopatógenos, se deben tener en cuenta aspectos inherentes a la biología de estos organismos, cuyo desconocimiento puede provocar errores graves de interpretación.

Así, cuando se desconocía que los caracteres morfométricos presentaban una marcada variabilidad intraespecífica condicionada por diversos factores, se cometieron numerosos errores en la identificación de las especies (Stanuszek, 1974).

En el caso de la detección y cuantificación de los JI que se encuentran en el suelo, se debe recordar que:

– la actividad entomopatógena no es desarrollada simultáneamente por todas las larvas (Fan y Hominick, 1990);

– cuando más de una especie ingresó en un insecto, se desarrolla sólo la que liberó primero y más rápidamente la bacteria endosimbionte estableciéndose una exclusión competitiva (Allatorre Rosas y Kaya, 1990; Koppenhöfer y Kaya, 1996);

– incrementando el tiempo de exposición del insecto aumentan los porcentajes de recuperación (Bednarek y Nowicki, 1991) pero el mayor número de nematodos penetra entre las primeras 24-48 horas (Fan y Hominick, 1990).

Por lo tanto, se debe tener en cuenta que mediante una técnica de detección indirecta sólo se recuperarán los JI activos en ese momento; que cuando hay varias especies se producen pérdidas debido a la exclusión competitiva y

que las observaciones deben realizarse durante al menos 48 horas.

Según se ha demostrado en este trabajo, la técnica rápida puede considerarse efectiva ya que permite detectar todos los JI activos cuando hay una única especie de nematodo; pone en evidencia la presencia de dos especies y los resultados se obtienen en 48 horas.

Finalmente, aparece conveniente que la recuperación de los nematodos se realice por disección manual, ya que al no sufrir deterioro pueden identificarse (Mauleon *et al.*, 1993).

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado con fondos provenientes del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT).

Obras citadas

- ALLATORRE ROSAS R. y KAYA H. K., 1990. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *J. Inv. Pathol.*, 55: 179-188.
- BEDDING R. A. y AKHURST R. J., 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.
- BEDNAREK A. y NOWICKI T., 1991. New estimation method for density of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) in the soil. *Rev. Nematol.*, 14: 638-639.
- DOUCET M. M. A. de, 1986. Técnica rápida para detectar nematodos entomófagos. *Rev. Cs. Agropec.*, 5: 57-63.
- FAN X. y HOMINICK W. M., 1991. Efficiency of the Galleria (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae, Heterorhabditidae) from sand and soil. *Rev. Nematol.*, 14: 381-387.
- HOMINICK W. M. y REID A. P., 1990. Perspectives on entomopathogenic nematodes. Pp. 327-343. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control* (R. Gaugler and H. K. Kaya Eds) CRC Press, Boston, U.S.A.
- KOPPENHÖFER A. M. y KAYA H. K., 1996. Coexistence of entomopathogenic nematodes species (Steinernematidae and Heterorhabditidae) with different foraging behavior. *Fund. appl. Nematol.*, 19: 175-183.

MAULEON H., BRIAND S., LAUMOND C. y BONIFASSI E., 1993. Utilisation d'enzymes digestives pour l'étude du parasitisme des *Steinernema* et des *Heterorhabditis* envers les larves d'insectes. *Fund. appl. Nematol.*, 16: 185-186.

POINAR G. O. JR., 1975. *A manual and host list of insects nematodes associations*. E. J. Brill, New York.

SOKAL R. R. y ROHLF F. J., 1980. *Introducción a la bioestadística*. Buenos Aires, Argentina, Reverté. 360 pp.

STANUSZEK S., 1974. Suggestions for unification of principles for describing nematodes of the genus *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Rhabditoidea, Steinernemati-
dae). *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Polinicznych*, 154: 361-393.