Control biológico

REPRODUCCIÓN DE *HETERORHABDITIS INDICA* EN CULTIVOS BIDIMENSIONALES ELABORADOS CON PROTEÍNA ANIMAL

Yirina Valdés Vázquez,[1] Antonio A. Lobaina Audevert,[1] María E. Márquez Gutiérrez[1], Maylen Gómez Pacheco[2] y Mercedes Escobar Hernández[1]

[1] *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, yvaldes@inisav.cu*

[2] *Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical. Calle 7a. no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana, ecologia@iift.cu*

RESUMEN

La reproducción in vivo *de nematodos entomopatógenos es altamente costosa y laboriosa, lo que trae aparejado una gran necesidad de elaboración de metodologías para su reproducción* in vitro *a gran escala. Con este objetivo se evaluó la reproducción y desarrollo de juveniles infectivos de* Heterorhabditis indica *[Poinar, Karunakar y David, 1992] sobre diferentes medios de cultivo bidimensionales, que se elaboraron por la combinación de hígado de pollo con almidón, así como hígado de cerdo con melaza, almidón y polvo de arroz. Los cuatro medios de cultivos permitieron la reproducción de los nematodos. Se destaca la variante con hígado de cerdo-polvo de arroz, que evidenció que la combinación entre la fuente de ácidos grasos y carbohidratos fue más eficaz que en el resto de las variantes.*

Palabras clave: *Heterorhabditis indica, nematodos, reproducción*

ABSTRACT

In vivo reproduction of entomopathogenic nematodes is highly cost and laborious, so it necessary to develope new methodologies for high level in vitro reproduction. The objective of this project was to evaluate the reproduction and development of infective juveniles of Heterorhebditis indica *[Poinar, Karunakar y David, 1992] in four bidimentional culture media. These culture media were elaborated combining chicken liver with starch and pork liver with molasses, starch and rice powder. Every culture medium allowed the reproduction of the nematodes primarily the variant with pork liver-rice powder due to the combination of fatty acids and carbohydrates present in this culture medium were more effective than in the rest culture media.*

Key words: *Heterorhabditis indica, nematodes, reproduction*

INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos ocupan un lugar muy importante en la lucha biológica como una alternativa más dentro de los métodos de control de plagas [Kaya y Gaugler, 1993] debido a que el uso indiscriminado de los plaguicidas químicos causa grandes afectaciones en la diversidad biológica. A pesar de haberse estudiado significativamente desde 1980 y de emplearse con buenos resultados en cultivos como cítricos, arroz, maíz y hortalizas [Arteaga, *et al*., 1996], aún su producción está muy limitada y no satisface la demanda.

La reproducción de estos organismos sobre larvas de insectos es muy costosa [Bedding, 1984], por lo que existen numerosas patentes que se refieren fundamentalmente a tecnologías para la reproducción masiva de forma artificial, como son el cultivo bidimensional, el tridimensional y la fermentación líquida. Estos métodos de reproducción *in vitro* se deben ajustar a la disponibilidad de materias primas, y que a su vez permitan una eficiente reproducción de los nematodos. Con este objetivo se evaluó en este trabajo la reproducción y desarrollo de juveniles infectivos de *Heterorhabditis indica* [Poinar, Karunakar y David, 1992] sobre cuatro medios de cultivo bidimensionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se elaboraron cuatro medios de cultivos nutritivos bidimensionales en combinaciones de hígado de pollo con almidón e hígado de cerdo con melaza, almidón y polvo de arroz. Por cada una de estas variantes se prepararon cuatro réplicas que se inocularon primeramente con la bacteria simbionte *Photorhabdus luminescens*

[Boemare, Akhurst y Mourant, 1993]. A las 48 h se realizaron dos perforaciones de 1 cm de diámetro en el centro de cada placa, donde se inocularon 6 000 juveniles infectivos de *H. indica*, previamente esterilizados con hipoclorito de sodio, y finalmente todo se incubó a 28°C.

El diseño empleado en este experimento fue completamente aleatorizado. A partir de las 24 h se realizaron observaciones diarias, y a los 13 días comenzó la recolección de los juveniles mediante el lavado de las placas con agua destilada esterilizada. Esta operación se repitió cuatro veces a intervalos de 24 h. Se contó la cantidad de nemátodos extraídos de cada uno de los medios de cultivo y se analizaron los datos mediante la dócima de comparación múltiple de Newman-Keuls con 5% de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro medios evaluados permitieron la reproducción de *H. indica*. Se observó que los juveniles inoculados en las placas se ubicaron en áreas con abundante crecimiento bacteriano, es decir, alrededor de las colonias de *P. luminescens*. Esto representa la gran relación que existe entre los nematodos y sus simbiontes, pues ellas son las responsables de transformar el sustrato y convertirlo en una fuente asequible para su alimentación [Forst y Clarke, 2002]. Como organismos microvívoros, estos nematodos pueden además alimentarse de la biomasa bacteriana, y esto garantiza que las nuevas generaciones también presenten la bacteria simbionte alojada en su intestino, lista para ser liberada en el interior de otro insecto hospedero [Boemare, 2002].

Otros autores plantean también la necesidad que tiene el nematodo de su simbionte bacteriano, fundamentalmente para el género *Heterorhabditis*, donde no se ha logrado la reproducción de nematodos axénicos [Gerritsen y Smits, 1993; Lunau *et al*., 1993], es decir, que no contengan la bacteria simbionte en su intestino.

A las 72 h de incubación se observaron hembras gigantes en todos los medios elaborados con hígado de cerdo, lo que evidenció el desarrollo de los juveniles infectivos a estado adulto. Durante la recolección de las nuevas generaciones de juveniles infestados (JI) la presencia de adultos fue mínima; sin embargo, en la combinación hígado de pollo-almidón las primeras hembras gigantes aparecieron a los 13 días, y el ciclo reproductivo se extendió hasta los 24. Cuando se recolectaron además los nemátodos de las placas, conjuntamente con los juveniles infectivos se extrajo un gran número de hembras en estado de gravidez.

Se conoce que cuando el nematodo llega al hemocele del insecto, sale de su estado de juvenil infectivo para reiniciar su desarrollo, proceso que es denominado *recuperación*. La mayoría de las señales para la ocurrencia de este evento se producen en la hemolinfa del hospedero; pero Grewal *et al*. (1997) demostraron que la bacteria simbionte también produce señales que controlan el desarrollo del nemátodo. Muchas de estas señales deben estar altamente relacionadas con la producción de metabolitos, pues cuando el simbionte bacteriano se cultiva artificialmente produce diferentes combinaciones de enzimas durante la etapa postexponencial del crecimiento [Thaler *et al*., 1998], y en el caso específico de la especie *P. luminescens*, Daborn *et al*. (2001) plantearon que también produce una metaloproteasa en esta misma fase del cultivo.

Todo este fenómeno antes descrito explica por qué la reproducción de *H. indica* sobre medios de cultivo elaborados con hígado de pollo ocurrió con tanto tiempo de diferencia con respecto a la reproducción sobre hígado de cerdo. Como estas fuentes de proteína tienen diferente composición, el hígado de pollo resultó de más difícil degradación para el simbionte bacteriano, la fase postexponencial de crecimiento se alcanzó más tarde, se retardó la producción de metabolitos y consigo la señal alimenticia que desencadenaría la recuperación de los juveniles infectivos.

En la *Fig. 1* se evidencian las diferencias significativas de la reproducción de *H. indica*. En las variantes con hígado de cerdo el número de juveniles obtenidos fue superior que con hígado de pollo.

Este resultado también está relacionado con la asincronía observada en el desarrollo de los juveniles, causado por su pobre recuperación. Gaugler y Han (2002) plantearon que esto conlleva la obtención de bajos rendimientos en las producciones.

Otra causa importante es que el contenido lipídico en el hígado de cerdo es superior que en el de pollo. En este sentido Yoo *et al*. (2000) enfatizaron la importancia de los lípidos ricos en ácidos grasos monoinsaturados para la elaboración de un medio de cultivo para *Heterorhabditis bacteriophora*. Hatab *y* Gaugler (1997) plantearon además que los lípidos metabolizados por los nematodos le proporcionan el 60% del total de su energía, de manera que su presencia es primordial en los medios de cultivo que se elaboren artificialmente para su reproducción.

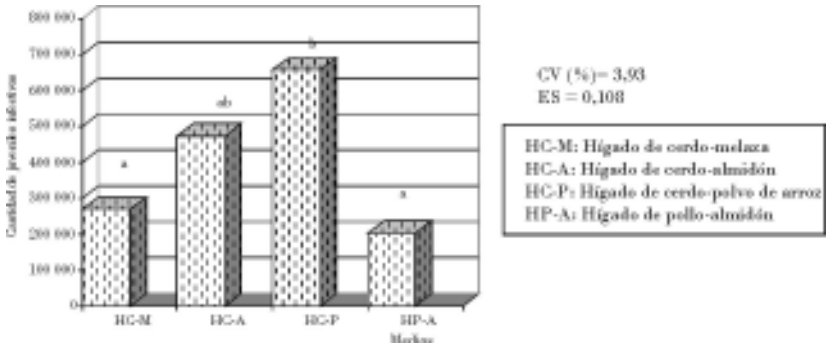


Figura 1. Número de juveniles infectivos obtenidos por medio de cultivo. (Letras iguales no difieren, $p < 0,05$).

Si se tiene en cuenta que los medios ensayados no fueron suplementados con lípidos ni sales, se puede corroborar que los hígados de cerdo y pollo aportaron suficiente cantidad de nutrientes como para permitir la reproducción de *H. indica*, pese a que los rendimientos no fueron tan elevados.

Finalmente estos resultados arrojaron que componentes del medio de cultivo como fuentes de proteínas, lípidos y carbohidratos, su origen y la forma en que ellos se combinan, influyen en la reproducción de *H. indica*, lo que coincide con autores como Gaugler y Han (2002). No obstante, ellos también plantearon que el establecimiento de todos estos parámetros depende de la especie de nemátodo por reproducir.

CONCLUSIONES

- Los cuatro medios de cultivo estudiados permitieron la reproducción y el desarrollo de *H. indica*.
- La mayor productividad se obtuvo con la combinación hígado de cerdo-polvo de arroz, mientras la variante hígado de pollo-almidón fue la menos productiva.

REFERENCIAS

Arteaga, E.; M. Montes; E. Fernández; B. Chang; V. Calzadilla; O. Vázquez; G. Plumas; V. García: «Organization of the Work with Entomopathogenic Nematodes in Cuba», Third Internacional Nematology Congress, Grosier, Guadalupe Antilles, French West Indies, 1996.

Bedding, R. A.: «Large Scale Production, Storage and Transport of the Insect-Parasitic Nematode *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp.», *Ann. Appl. Biol*. 104:117-120, 1984.

Boemare, N.: «Biology, Taxonomy and Systematics of Photorhabdus and Xenorhabdus», *Entomopathogenic Nematology*, New York, CABI Publishing, 2002, pp: 35-56.

Daborn, P. J.; N. Waterfield; M. A. Blight; R. French-Constant: «Measuring Virulence Factor Expression by the Pathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* in Culture and During Insect Infection», *Journal of Bacteriology* 183:5834-5839, 2001.

Forst, S.; D. Clarke: «Bacteria-Nematode Symbiosis», *Entomopathogenic Nematology*, New York CABI Publishing, 2002, pp. 57-77.

Gaugler, R.; R. Han: «Production Technology», *Entomopathogenic Nematology*, New York, CABI Publishing, 2002, pp. 289-310.

Gerritsen, L. J. M.; P. H. Smits: «Variation in Pathogenicity of Recombinations of *Heterorhabditis* and *Xenorhabdus luminescens* strain», *Fundam. Appl. Nematol*. 16:367-373, 1993.

Grewal, P. S.; M. Matsuura; V. Converse: «Mechanisms of Specificity of Association Between the Nematode *Stinernema scapterisci* and Its Symbiotic Bacterium», *Parasitology* 114:483-488, 1997.

Hatab, M. A.; R. Gaugler: «Growth-Mediated Variations in Fatty Acid of *Xenorhabdus* sp.», *Journal of Applied Microbiology* 82:351-358, 1997.

Kaya, H. K.; R. Gaugler: «Entomopathogenic Nematodes», *Annu. Rev. Entomol.* 38:181-206, 1993.

Lunau, S.; S. Stoessel; A. J. Schmidt-Peisker; R. U. Ehlers: «Establishment of Monoxenic Inocula for Scaling Up for *in Vitro* Culture of Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp.», *Nematologica* 39:385-399, 1993.

Thaler, J. O.; B. Duvic; A. Givaudan; N. Boemare: «Isolation and Entomotoxic Properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase», *Applied and Environmental Microbiology* 64:2367-2373, 1998

Yoo, S. K.; I. Brown; R. Gaugler: «Liquid Media Development for *Heterorhabditis bacteriophora*: Lipid Source and Concentration», *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:759-763, 2000.