

I. INTRODUCCIÓN	57
II. MATERIALES Y MÉTODOS	58
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
IV. RESUMEN Y SUMMARY	61
V. BIBLIOGRAFÍA	63

TECNICA RAPIDA PARA DETECTAR NEMATODOS ENTOMOFAGOS

MARÍA M. A. DE DOUCET *

I. INTRODUCCION

La categoría de los nematodos entomófagos está constituida principalmente por representantes de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Rhabditida).

Las larvas infestantes de estos nematodos (estadio tercero) son las únicas que viven libremente en el suelo, cuando penetran en un insecto lo matan. El resto de los estadios larvales y los adultos, se encuentran siempre dentro de los cadáveres de los huéspedes (generalmente larvas de lepidópteros y coleópteros).

En la naturaleza, estos nematodos suelen detectarse mediante el uso de métodos directos o indirectos. Los primeros consisten en disecar los insectos muertos encontrados en el suelo y los segundos en utilizar un huésped auxiliar.

Los métodos directos son poco prácticos y tienen sus limitaciones ya que, si la densidad de población de insectos es escasa, hace falta remover gran cantidad de suelo; a temperaturas elevadas la desintegración de los cadáveres es rápida; si la temperatura es baja la infestación no se lleva a cabo. En consecuencia son pocas las probabilidades de encontrar estos nematodos.

Los métodos indirectos consisten en colocar en el suelo larvas de insectos susceptibles de ser atacadas. La polilla de la cera *Galleria mellonella*

* Carrera del Investigador (CONICET) — Centro de Zoología Aplicada — FCEF y N — UNC.

Recibido: 20 de Mayo de 1983 - Aceptado: 13 de Octubre de 1983.

(L) (Gatleriidae) es un excelente huésped auxiliar: se cría fácilmente en el laboratorio y es altamente sensible al ataque de los nematodos entomófagos.

Los primeros métodos indirectos estribaron en colocar las larvas de insectos, libres o encerradas en pequeñas jaulas de tela metálica en cavidades efectuadas en el suelo (Bedding y Akhurst, 1976; Poinar, 1975). Transcurridos de siete a diez días se recuperan. Este procedimiento es práctico pero existen los factores limitantes de la temperatura y la necesidad de volver al lugar de muestreo. Los primeros autores antes mencionados, comprobaron además que se puede detectar la presencia de estos nematodos llevando la muestra de suelo al laboratorio y poniéndola en contacto con las larvas de *G. mellonella*. Esta técnica supera las dificultades de las anteriores, ya que no hay necesidad de volver al lugar de muestreo, la temperatura es controlada y las larvas no son predadas por otros agentes. No obstante, si se desean procesar muchas muestras de suelo, se debe disponer de salas climatizadas, amplio espacio y una población numerosa de *G. mellonella*.

En este trabajo se describe una técnica simple que permite detectar la presencia de larvas infestantes de nematodos entomófagos en suelo, procesando la muestra en el laboratorio, en espacio y tiempo reducidos. Se realiza además un estudio comparativo con las técnicas de Bedding y Akhurst.

II. MATERIALES Y METODOS

La técnica propuesta resulta de la conjugación de métodos clásicos para la extracción de nematodos del suelo (Dalmaso, 1968; Canavess y Jensen, 1955) y de la técnica de cría de *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Dutky et al., 1964).

Modo operatorio

La muestra de suelo se introduce en un colador metálico de 2 mm de abertura de malla, el cual se coloca sobre un balde de 5 lts. de capacidad. La muestra se hace pasar a través del colador volcando agua sobre la misma. Los elementos gruesos retenidos en el colador se desechan y el suelo en suspensión se homogeneiza con una leve agitación. Luego de dejar decantar la fase mineral, el sobrenadante se pasa a través de un tamiz de apertura de malla de 40 μ m. El material retenido se recupera con un fino chorro de agua en un vaso de precipitado de 200 cc, teniendo la precaución de realizarlo con la menor cantidad de líquido posible. Esta operación de flotación-tamizado se repite cuatro veces para cada muestra.

El material obtenido en el vaso de precipitado se transfiere a uno de centrifuga y se opera durante dos minutos a 1800 g.

El sobrenadante se desecha. El sedimento se recupera y se coloca sobre cinco a siete discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro, contenidos en cápsulas de Petri standard previamente esterilizadas.

Finalmente se introducen en la caja de Petri diez larvas de *G. mellonella* de los últimos estadios y el todo en una estufa de cultivo a 25 °C.

A las 48 horas se realiza la primera observación y a los cinco días la última.

Por razones de practicidad, se recomienda trabajar con muestras no mayores a un kilogramo.

Técnica de Bedding y Akhurst

Se colocaron diez larvas de polilla en recipientes de poliestireno y se volcó suelo contaminado artificialmente a concentraciones conocidas (ver preparación del material).

La primera observación se efectuó a los seis días y la segunda a los diez.

Los cadáveres de insectos fueron disecados para determinar si la muerte se había producido por los nematodos.

Estudio comparativo

El estudio se realizó utilizando suelo infestado artificialmente con *N. carpocapsae* y *G. mellonella* como huésped auxiliar. Se trabajó a temperatura constante de 25 °C.

Preparación del material

Se colocaron 100 grs. de suelo esterilizado en cajas de poliestireno de 300 cc de capacidad. Se construyeron tres lotes a los cuales se inoculó con 10, 50 y 100 larvas de nematodos, respectivamente.

Se consideraron para cada técnica, 15 unidades experimentales por inóculo.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos con el método propuesto se resumen en la fig. n° 1. Los valores encontrados evidenciaron que la técnica es efectiva: la presencia de los nematodos se detectó en prácticamente todas las unidades experimentales y la totalidad de los resultados se obtuvo en cuatro días.

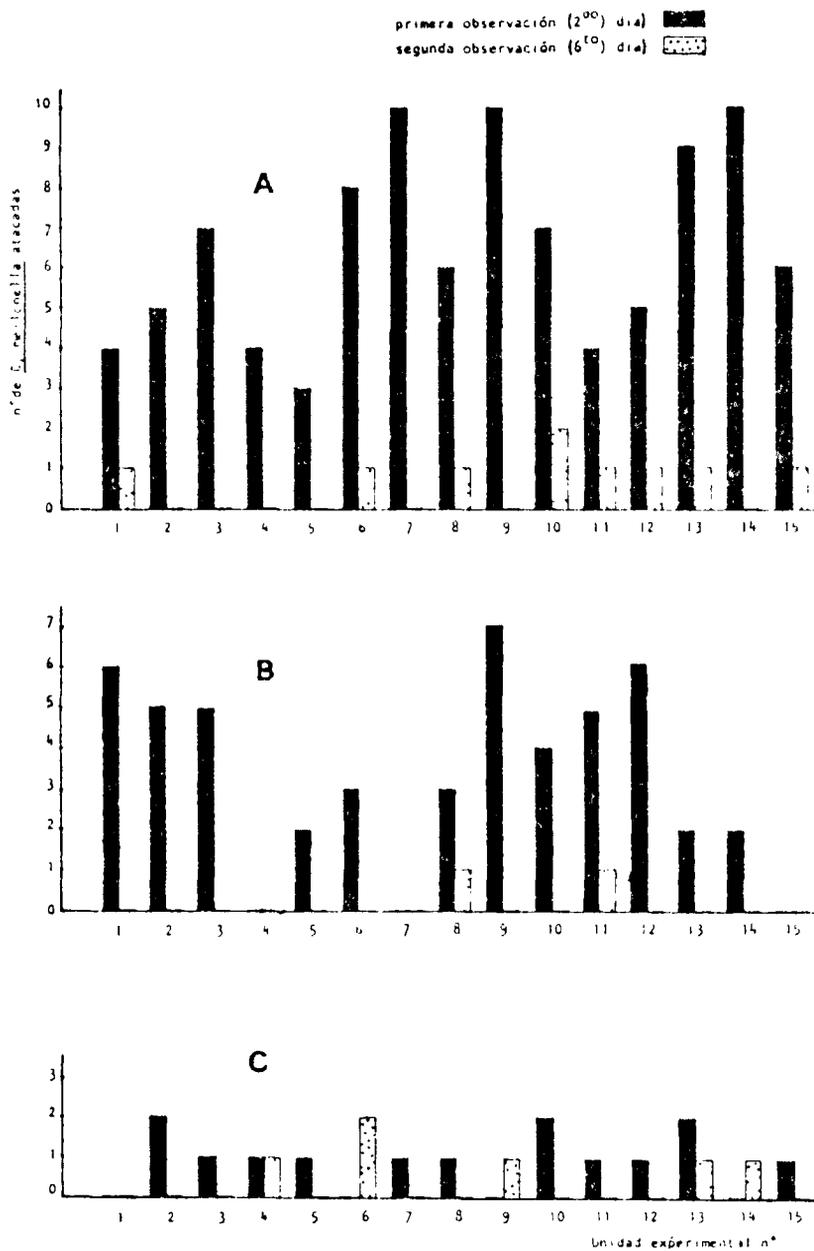


FIG. 1.— Resultados obtenidos aplicando la técnica descrita para la búsqueda de nematodos entomófagos. Número de *G. mellonella* atacadas por *N. carpocapsae*, en las 15 unidades experimentales estudiadas, luego de dos y cuatro días, en tres variantes de concentración del agente.

A: 100 / 100; B; 50 / 100 y C: 10 / 100 (nematodos / 100 granos de suelo)

Los resultados obtenidos aplicando esta técnica y la de Bedding Akhurst se confrontan en la fig. nº 2.

Tal como se observa, ambos procedimientos dieron resultados totales semejantes. Esto se corroboró realizando un análisis de frecuencia, empleando un test de χ^2 (chi²). Los valores resultantes fueron:

nematodos/gr. de suelo	χ^2
10/100	1,68
50/100	0,42
100/100	0,74

Estos resultados, enfrentados al valor crítico de χ^2 , trabajando con un grado de libertad, se revelaron poco significativos ($0,95 > p > 0,05$) por lo que se considera que, efectivamente en ambos métodos se obtienen resultados análogos. No obstante, con la técnica propuesta, la presencia de entomófagos se detectó en más unidades, particularmente en las bajas concentraciones de larvas infestantes (fig. nº 2: A). Es de destacar que esta técnica es también más operativa en tiempo, obteniendo los resultados en cuatro días, contra diez por la de los autores antes mencionados.

Este método indirecto descripto, basa su eficiencia en:

- favorecer el encuentro espacio-temporal de la pareja huésped-parásito concentrando la nematofauna de la muestra de suelo y colocando el conjunto en espacio reducido.
- brindar condiciones óptimas de temperatura para la actividad de las larvas infestantes.

Su aplicación en la búsqueda de focos naturales ha sido efectiva (Doucet, 1982). Además, puede aplicarse a estudios de distribución y abundancia mediante la simple observación periódica de las larvas atacadas.

IV. RESUMEN

Se describe una técnica que permite detectar rápidamente la presencia de larvas infestantes de nematodos entomófagos en suelo. Esta técnica es el resultado de la conjugación de los procedimientos clásicos en la extracción de nematodos del suelo y de la producción de entomófagos en el laboratorio. El huésped, auxiliar utilizado es *G. mellonella*. La totalidad de los resultados se obtienen al cuarto día de comenzada la experiencia, teniendo al segundo más del 50 % de la información.

La técnica descripta se compara con la ideada por Bedding y Akhurst utilizando suelo infestado artificialmente con *N. carpocapsae* en concentraciones conocidas.

Técnica de Bedding y Akhurst 
 Técnica propuesta 

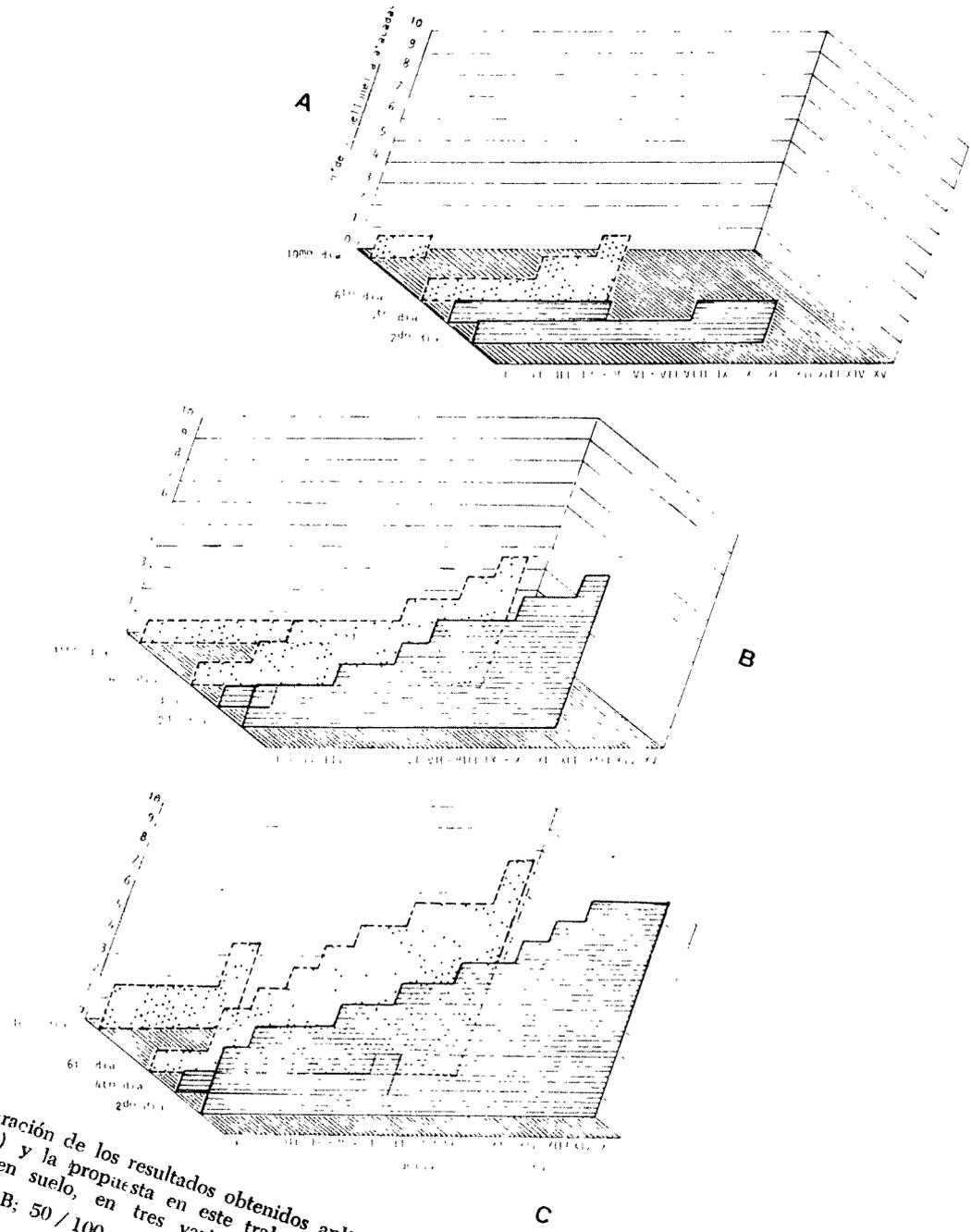


Fig. 2.— Comparación de los resultados obtenidos aplicando las técnicas de Bedding y Akhurst (1975) y la propuesta en este trabajo, para la búsqueda de nematodos entomófagos en suelo, en tres variantes de concentración del agente.
 A: 100 / 100; B; 50 / 100 y C: 10 / 100 (nematodos / 100 granos de suelo)

SUMMARY

A technique for detecting the presence of entomophagous nematodes in soil is described. The technique is a result of the combination of practical means to extract the soil nematodes and the mass propagation of entomophagous in the laboratory. The greater wax moth *G. mellonella* is used as the auxiliary host. Results are obtained in four days. The technique described is compared to a Bedding and Akhurst's method, testing in the laboratory soil samples experimentally infected with *Neoplectana carpocapsae* Weiser.

V. BIBLIOGRAFIA

- BEDDING, R. A. y R. J. AKHURST. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21, 109-110.
- CAVENESS, F. E. y H. J. JENSEN. 1955. Modification of centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Hem. Soc. Wash.* 22, 87-89.
- DALMASSO, A., 1966. Méthode simple d'extraction des nématodes du sol. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 3, 473-478
- DOUCET, M. M. A. de, 1982. Introducción al estudio de los nematodos entomófagos de la provincia de Córdoba, Argentina. Abstr. II Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Buenos Aires, Argentina, 21-26 de noviembre.
- DUTKY, S. R., J. V. THOMPSON y G. E. CANTWELL, 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.*, 6, 417-422.
- POINAR, G. O. Jr., 1975. Entomogenous nematodes. *E. J. Brill*, Leiden, 317 pp.