

PRESENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN SUELOS DE CASTAÑO EN GALICIA

PICOAGA, A.¹; ABELLEIRA, A.¹ Y MANSILLA, J.P.^{1,2}

¹ Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación Pontevedra), Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra, efa@efa-dip.org

² Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

Palabras clave: *Heterorhabditis*, identificación, lucha biológica, plagas, *Steinernema*

Resumen: Los nematodos entomopatógenos (NEPs) son parásitos obligados de insectos ya que presentan un tercer estadio juvenil resistente (IJ) de vida libre que es la forma infectiva que penetra en la larva del insecto a hospedar, matándola en 24-48 h, por lo que son altamente efectivos como insecticidas biológicos. En varios países europeos se han realizado estudios en los que se muestra su eficacia para combatir diferentes plagas de insectos que afectan al fruto del castaño como curculiónidos y tortricidos. En este trabajo se pretende detectar la presencia de NEPs en suelo de castaño con los que poder iniciar un programa de lucha biológica contra *Curculio elephas* y *Cydia* spp., plagas que causan los mayores daños en el castaño en Galicia. Para ello se han tomado muestras en 30 sotos característicos de nuestra Comunidad analizando los nematodos entomopatógenos presentes mediante la técnica de trampas-cebo (BEDDING & AKHURST, 1975) con larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Hasta el momento se han identificado, por análisis morfológicos y morfométricos y por técnicas moleculares, nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* en 4 de los sotos muestreados.

INTRODUCCIÓN

La explotación del castaño (*Castanea sativa* Mill.) en Galicia ha sido fundamental desde siempre ya que su fruto ha sido un recurso básico para alimentación, y su madera un material para la construcción. Actualmente, se produce en Galicia alrededor del 50% de la producción total de castaña que se obtiene en España, siendo la provincia de Ourense la primera a nivel nacional en número de empresas dedicadas a la comercialización y transformación de castañas (MANSILLA et al., 2000).

Uno de los problemas que presenta el castaño en Galicia son las plagas de curculiónidos y tortricidos que afectan al fruto haciéndolo inservible para su comercialización. Los que causan mayores daños en Galicia son *Cydia splendana* Hb., *Curculio elephas* Gyll. y *Cydia fagiglandana* Zel. (MANSILLA et al., 2000). Todos ellos penetran en el fruto, se desarrollan en él y excavan galerías dejando orificios de salida que ocasionan grandes pérdidas en la calidad del producto.

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) son parásitos obligados que afectan a una gran variedad de insectos del suelo. Se conocen dos géneros: *Heterorhabditis* Poinar y *Steinernema* Travassos, cada uno de ellos asociados simbióticamente a sendas bacterias de los géneros *Photorhabdus* Boemare, Akhurst y Mourant y *Xenorhabdus* Thomas y Poinar.

El ciclo de vida de los NEPs presenta un estadio de vida libre denominado juvenil resistente. Esta es una forma infectiva (IJ) que permanece en el suelo hasta que encuentra una larva de insecto a la que hospedar, se introduce en ella a través de orificios naturales (boca, ano, espiráculos) y libera la bacteria asociada, que mata al insecto por septicemia en 24-48 h. Tras la muerte del insecto, la bacteria descompone los tejidos y produce antibióticos que

impiden el crecimiento de otros microorganismos, lo que facilita el desarrollo y reproducción de los nemátodos en el interior del insecto. Cuando se agotan los recursos, la última generación de NEPs abandona la larva para comenzar un nuevo ciclo en el suelo como juveniles infectivos.

Los NEPs poseen numerosas ventajas como insecticidas biológicos: afectan a una amplia variedad de insectos, no contaminan el medio ambiente y son fácilmente aplicables y efectivos en zonas donde los productos químicos no lo son.

En España no hay registrado, hasta el momento, ningún producto fitosanitario para el castaño con el que realizar un control químico de plagas de curculiónidos y tortricidos, por lo que la utilización de NEPs se plantea como una solución al ataque de estos insectos.

Estudios realizados en varios países, tanto en campo como en laboratorio, muestran que estos nematodos son efectivos contra plagas que afectan al fruto del castaño (KEPENEKCI et al., 2004; CLAUSI & VINCIGUERRA, 2005; KUSKE, 2005) observando que los nematodos del género *Steinernema* presentan una mayor afinidad por larvas de tortricidos, mientras que los heterorhabdítidos prefieren larvas de curculiónidos.

En este trabajo se han muestreado los principales sotos de la zona sur de Galicia con el fin de determinar la presencia de NEPs adaptados a suelos de castaño, que permita realizar un programa de control biológico contra las principales plagas que afectan al fruto del castaño.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los muestreos para detectar la presencia de nematodos entomopatógenos en suelos de castaño en Galicia se realizaron en 30 sotos de las provincias de Pontevedra y Ourense (Figura 1), basando la selección de los puntos de muestreo en la distribución de los sotos gallegos, más abundantes en esta última provincia. Este se llevó a cabo durante los meses de enero a mayo de 2007. En cada uno de los puntos se mezclaron 5 muestras de suelo recogidas al azar, de aproximadamente 500 g, a una profundidad de 0-30 cm. En el laboratorio se repartieron las tierras de las 30 localizaciones en 227 submuestras a las que se le aplicó la técnica de extracción descrita por BEDDING & AKHURST (1975) que se basa en la utilización de trampas-cebo con larvas de *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) en su último estadio larvario. Las larvas que presentaban síntomas de ataque de nematodos se pasaron a trampas White modificadas (KAYA & STOCK, 1997) y se incubaron a 24 °C, recogiendo del agua, al cabo de 7 días aproximadamente, los juveniles infectivos.

La identificación a nivel de especie de los nematodos aislados se realizó por morfología y morfometría, y por técnicas moleculares mediante secuenciación de ADN. El análisis morfológico solo se efectuó con heterorhabdítidos debido a la escasez de individuos del género *Steinernema* y su dificultad para multiplicarlos en laboratorio.

Para los análisis morfológicos y morfométricos se midieron 25 juveniles resistentes y 25 machos de primera generación. La observación al microscopio óptico se realizó a partir de preparaciones semipermanentes siguiendo el método descrito por GÓMEZ et al. (2004). Los caracteres considerados para la identificación han sido: longitud total, anchura máxima, distancia del extremo anterior al poro excretor, longitud del esófago, longitud de la cola, longitud de las espículas, longitud del gubernáculo y los índices c, D, E y GS (HOMINICK et al., 1997).

Para la identificación por técnicas moleculares de los nematodos del género *Steinernema* se secuenciaron la región ITS del ADN nuclear ribosomal, utilizando los primers 18S y 26S descritos por VRAIN et al. (1992), y el gen *cox1* del ADN mitocondrial, utilizando el protocolo descrito por NADLER et al. (2006). En el caso de los nematodos del género *Heterorhabditis* la secuenciación se realizó utilizando los primers TW81 y AB28, descritos por JOYCE et al. (1994) que amplifican la región ITS del ADNnr.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha detectado presencia de nematodos entomopatógenos en 4 de los 30 sotos analizados, lo que supone un porcentaje de abundancia del 13,3 % (Figura 1).

La presencia de los NEPs en el suelo varía por numerosos factores, no sólo físicos como granulometría, textura, humedad, temperatura, aireación o pH del suelo (BARBERCHECK, 1992) sino también por biológicos como la abundancia de insectos huésped en el medio. Esto repercute en que los porcentajes de recuperación oscilen entre rangos tan extremos del 0.7 al 70.1% (MRACEK & BECVAR, 2000).

En España se han realizado estudios de presencia de nematodos entomopatógenos en Cataluña (GARCÍA DEL PINO & PALOMO, 1996) en suelos de terreno cultivado, bosque y prado natural y en La Rioja (CAMPOS et al., 2007) en el mismo tipo de suelos, alcanzando un porcentaje de aislamiento del 23.3% y 14% respectivamente.

En este trabajo se pretende determinar la presencia de especies de NEPs en suelos de castaño que puedan utilizarse para realizar un control biológico sobre curculiónidos y tortricidos. En España no hay estudios en esta especie forestal y en otros países los incluyen en prospecciones que realizan sobre diferentes hábitats.

Según la bibliografía consultada sobre esta especie, MRACEK et al. (1999) hicieron un muestreo en varios ecosistemas de Republica Checa incluyendo sotos de castaños. Aunque el porcentaje de recuperación global fue muy elevado (53.8%), no detectaron NEPs en los suelos de castaño. Por el contrario, CLAUSI & VINCIGUERRA (2005) encontraron juveniles de *H. bacteriophora* y de *S. feltiae* en un estudio específico en 6 sotos de castaño en Italia, observando NEP en la mayoría de los sotos muestreados (83.3%).

De los cuatro sotos en los que se observó presencia de NEPs, en tres se han aislado nematodos del género *Steinernema*, y en el cuarto, del género *Heterorhabditis* (Tabla 1).

Los heterorhabdítidos recuperados en el punto 4 de muestreo correspondiente a Areiro, han sido identificados como *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. La identificación de las muestras se ha llevado a cabo por análisis morfológicos y morfométricos, coincidiendo las observaciones realizadas con las detalladas por ADAMS & NGUYEN (2002), y por secuenciación, confirmando los resultados obtenidos por morfología. *H. bacteriophora* es una especie de NEPs que presenta una amplia área de distribución. En España ya ha sido descrita asociada a suelos de castaño (PICOAGA et al., 2007). Esta especie suele habitar en zonas próximas al mar, de suelos arenosos y con temperaturas suaves, condiciones presentes en Areiro, que es una zona costera con temperatura media anual de 22 °C.

Los steinernemátidos aislados en los puntos de muestreo 13 y 15 se identificaron como *Steinernema affine* Bovien. Para realizar esta identificación se secuenciaron dos regiones diferentes: una mitocondrial y otra nuclear, obteniendo al comparar las secuencias resultantes con la base de datos del Genbank, una homología del 99% en el caso del gen *cox1*, y un mínimo del 97% para la región ITS. Los nematodos aislados del punto de muestreo 24 correspondiente con Parada de Sil se han identificado a nivel de género como *Steinernema* debido al escaso número de nematodos recuperados.

La identificación por morfología a nivel de especie no se ha podido realizar a los steinernemátidos obtenidos en ninguno de los tres puntos de muestreo debido a la escasez de individuos. En estudios posteriores se intentará corroborar la identificación de esta especie por morfología y morfometría.

Ésta es la primera vez que se aísla *Steinernema affine* asociada a suelo de castaño en España, ya que solamente ha sido citada en Europa mayoritariamente asociada a suelos de bosque y pradera. En España ha sido descrita por GARCÍA DEL PINO & PALOMO (1996) en suelos de bosque mediterráneo. Las tres localizaciones de la provincia de Ourense presentan características propicias para la supervivencia de los steinernemátidos, ya que

tienen preferencia por zonas de bosque y pradera con temperaturas medias del suelo de 14 °C (BARBERCHECK, 1992).

Este trabajo forma parte de los estudios que se están llevando a cabo actualmente en nuestra comunidad, en los que ya se han realizado ensayos de persistencia de nematodos entomopatógenos en sotos de castaño, comprobando que pueden permanecer viables en el suelo durante al menos 4 meses (PICOAGA *et al.*, 2007).

El conocimiento de los nematodos entomopatógenos en nuestros sotos nos va a permitir efectuar ensayos de eficacia y evaluar su efectividad en la lucha contra los principales carpófagos del castaño.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, B.J. & NGUYEN, K.B.; 2002. Taxonomy and systematics. *In*: Gaugler, R. (ed.), *Entomopathogenic Nematology*: 1-33. CABI Publishing. Wallingford, U.K.
- BARBERCHECK, M.E.; 1992. Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. *Fla. Entomol.* 75:539-548.
- BEDDING, R.A. & AKHURST, R.J.; 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-116.
- CAMPOS-HERRERA, R.; ESCUER, M.; LABRADOR, S.; ROBERTSON, L.; BARRIOS, L. & GUTIÉRREZ, C.; 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 95: 125-139.
- CLAUSI, M. & VINCIGUERRA, M.T.; 2005. I nematodo entomopatógeni in un progetto per lo sviluppo sostenibile dei castagneti. *Nematol. Mediter.* 33:91-94.
- GARCÍA DEL PINO, F. & PALOMO, A.; 1996. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in spanish soils. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 84-90.
- GÓMEZ, L.; CAMPOS, R.; SÁNCHEZ, L. y RODRÍGUEZ, M.; 2004. Método rápido de preparación de nematodos entomopatógenos para la observación en microscopio óptico. *Rev. Prot. Veg.* 19: 67-68.
- HOMINICK, W.M.; BRISCOE, B.R.; GARCÍA DEL PINO, F.; HENG, J.; HUNT, D.J.; KOZODOY, E.; MRACEK, Z.; NGUYEN, K.B.; REID, A.P.; SPIRIDONOV, S.; STOCK, S.P.; STURHAN, D.; WATURU, C. & YOSHIDA, M.; 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.* 71: 271-298.
- JOYCE, S.A.; GRIFFIN, C.T. & BURNELL, A.M.; 1994. The use of isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins in the taxonomy of the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 40: 601-612.
- KAYA, H.K. & STOCK, S.P.; 1997. *Manual of techniques in insects pathology*. L.A. Lacey. Academic Press. USA.
- KEPENEKCI, I.; GOKCE, A. & GAUGLER, R.; 2004. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica* 34: 199-204.
- KUSKE, S.; 2005. Control of chestnut weevils with entomopathogenic nematodes: first experiences. *Second International Symposium on Biological Control of Arthropods*. Davos, Switzerland. September 12-16, 2005.
- MANSILLA, J.P.; PÉREZ, R.; PINTOS, C.; SALINERO, C. y IGLESIAS, C.; 2000. *Plagas y enfermedades del castaño en Galicia*. Xunta de Galicia. Consellería de Política Agroalimentaria e Desenvolvemento Rural. Santiago de Compostela.

- MRACEK, Z.; BECVAR, S. & KINDLMANN, P.; 1999. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic. *Folia Parasit.* 46: 145-148.
- MARCEK, Z. & BECVAR, S.; 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. *Nematology* 2: 297-301.
- NADLER, S.A.; BOLOTIN, E. & STOCK, S.P.; 2006. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Syst. Parasitol.* 63: 161-181.
- PICOAGA, A; ABELLEIRA, A. y MANSILLA, J.P.; 2007. Primeros estudios de la diversidad y persistencia de nematodos entomopatógenos en suelos de castaño en Galicia. *II Congreso Iberico do castanheiro*. Vila Real, Portugal. Junio 20-22, 2007.
- VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LEVESQUE, A.C. & HAMILTON, R.I.; 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanun* group. *Fundam. Appl. Nematol.* 15: 563-574.

Tabla 1. Fecha de muestreo y situación geográfica de los sotos con presencia de NEP.

Nº	Fecha	Localidad	Provincia	UTM (29T)	NEP
4	14.12.06	Areiro	Pontevedra	526866X/4694946Y	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
13	14.05.07	O Bolo	Ourense	656326X/4685669Y	<i>Steinernema affine</i>
15	14.05.07	Viana do Bolo	Ourense	657057X/4672518Y	<i>Steinernema affine</i>
24	15.05.07	Parada de Sil	Ourense	620484X/4692651Y	<i>Steinernema</i> sp.

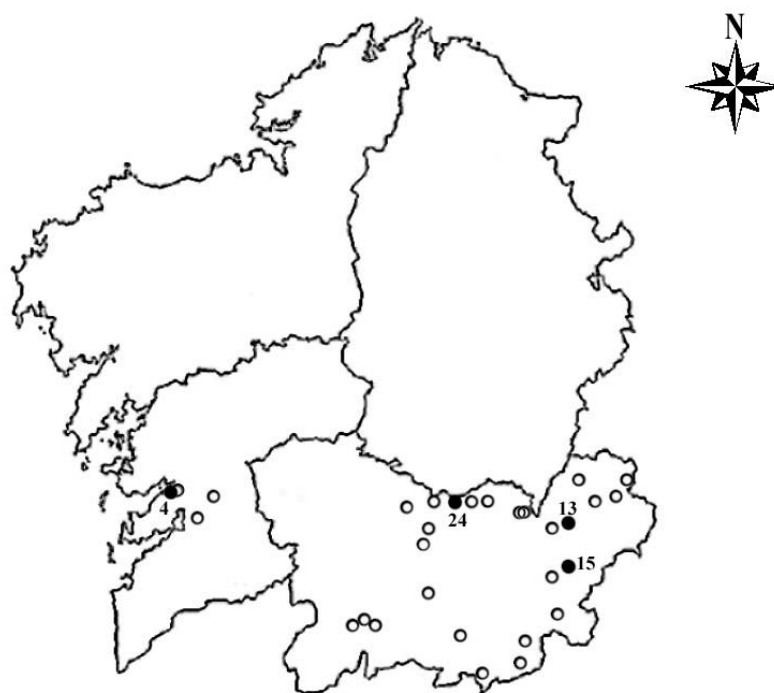


Figura 1. Puntos de muestreo de nematodos entomopatógenos en Galicia. ○, ausencia de NEP. ●, presencia de NEP. Los números indican la localización de las muestras con presencia de NEP.