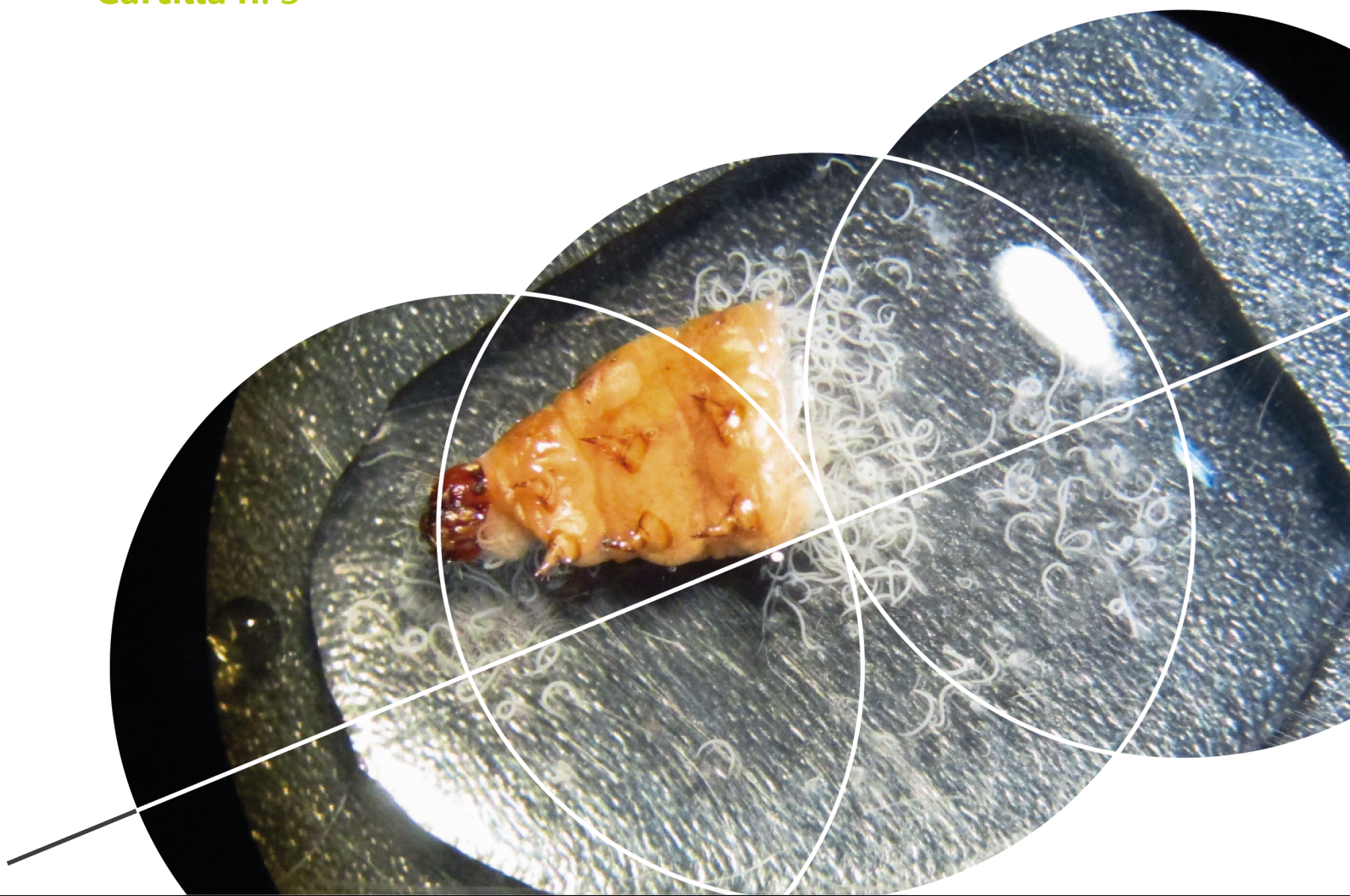
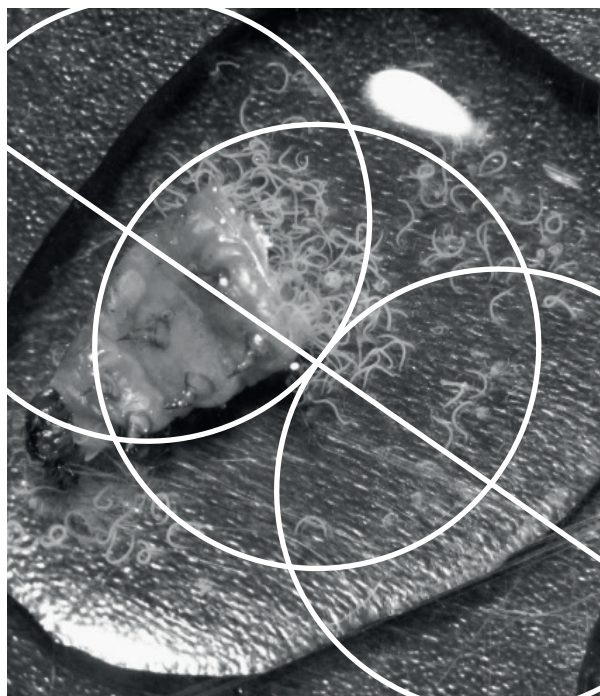


NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS: UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LOS PICUDOS DEL PLÁTANO

Cartilla n. 5





NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS:
UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL
DE **PICUDOS** ^{DEL} **PLÁTANO**

**NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS:
UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL
DE LOS PICUDOS DEL PLÁTANO**

Miguel Uribe

Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Donald Riascos Ortiz



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

2020

Nematodos entomopatógenos: una alternativa para el control de los picudos del plátano

© Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira

© Facultad de Ciencias Agropecuarias

© Miguel Uribe, Jaime Eduardo Muñoz, Donald Riascos Ortiz, autores, 2020.

Primera edición, 2020

ISBN: 978-958-794-338-2

eISBN: 978-958-794-339-9

Dirección de Investigación y Extensión Sede Palmira - DIEPAL

Carrera 32 # 12-00

+57 (2) 2868842 ext. 35142 - 35242

comite_editorial_pal@unal.edu.co

Palmira, Colombia

Impreso y hecho en Palmira, Valle, Colombia.

Esta obra se encuentra bajo una licencia creative commons Atribución/Reconocimiento-NoComercial-SinDerivados 4.0 Licencia Pública Internacional – CC BY-NC-ND 4.0



Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Uribe Londoño, Miguel

Nematodos entomopatógenos: una alternativa para el control de los picudos del plátano / Uribe, Miguel, Muñoz Flórez, Jaime Eduardo, Riascos Ortiz, Donald. – 1ª. edición : Palmira, Valle del Cauca : Universidad Nacional de Colombia, 2020.

36 páginas : fotos, 21 cm ; - (Ciencias agrícolas)

Incluye bibliografía

ISBN: 978-958-794-338-2 (papel)

ISBN: 978-958-794-339-9 (digital)

1. Nematodos entomófilos 2. Control biológico 3. Cultivos 4. Curculionidae
I. Uribe Londoño, Miguel II. Muñoz Flórez, Jaime Eduardo III. Riascos Ortiz, Donald.

632.625 7 / CDD-22

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	9
EL COMPLEJO DE PICUDOS DE PLÁTANO.....	10
NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS	12
CICLO DE VIDA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	13
AISLAMIENTO DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	14
CONSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	17
MULTIPLICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	19
PROSPECTIVAS PARA EL CONTROL DEL COMPLEJO DE PICUDOS DEL PLÁTANO Y BANANO CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	20
CONCLUSIONES.....	21
AGRADECIMIENTOS.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25

INTRODUCCIÓN

El Valle del Cauca tiene 27 844 hectáreas sembradas en plátano y banana, con una producción 258 337 toneladas, lo cual beneficia a 12 500 productores (Mader, 2020). Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por problemas fitosanitarios ampliamente diseminados.

Entre los problemas fitosanitarios más limitantes se mencionan las enfermedades denominadas «moko» cuyo agente es la bacteria *Ralstonia solanacearum* y «mal de Panamá» o marchitamiento vascular por el hongo *Fusarium oxysporum* (Alarcón y Jiménez, 2012).

Así mismo, los insectos plaga que mayor daño causan a los cultivos de plátano y banano son el picudo negro *Cosmopolites sordidus*, el picudo rayado *Metamasius hemipterus*, el picudo amarillo *M. hebetatus* y *M. submaculatus* (Vallejo *et al.*, 2007; Sepúlveda-Cano y Rubio-Gómez, 2009; Weissling y Giblin-Davis, 2016).

EL COMPLEJO DE PICUDOS DE PLÁTANO

El complejo de picudos del plátano y banano en Colombia comprende seis insectos de las especies *C. sordidus*, *M. hemipterus*, *M. hebetatus*, *M. submaculatus*, *Rhynchophorus palmarum* y *Polytus mellerborgii* (Muñoz, 2007; Vallejo *et al.*, 2007; Sepúlveda-Cano y Rubio-Gómez, 2009; Weissling y Giblin-Davis, 2016).

De estas especies, las dos primeras son los más limitantes y, por ello, las más estudiadas (figura 1). Se conoce que son de hábito nocturno, suelen permanecer toda su vida en el cultivo y son difíciles de hallar. Así mismo, las larvas desarrollan todos sus estadios en el interior de la planta, ocasionando disminución en los rendimientos (Vallejo *et al.*, 2007; Weissling y Giblin-Davis, 2016).

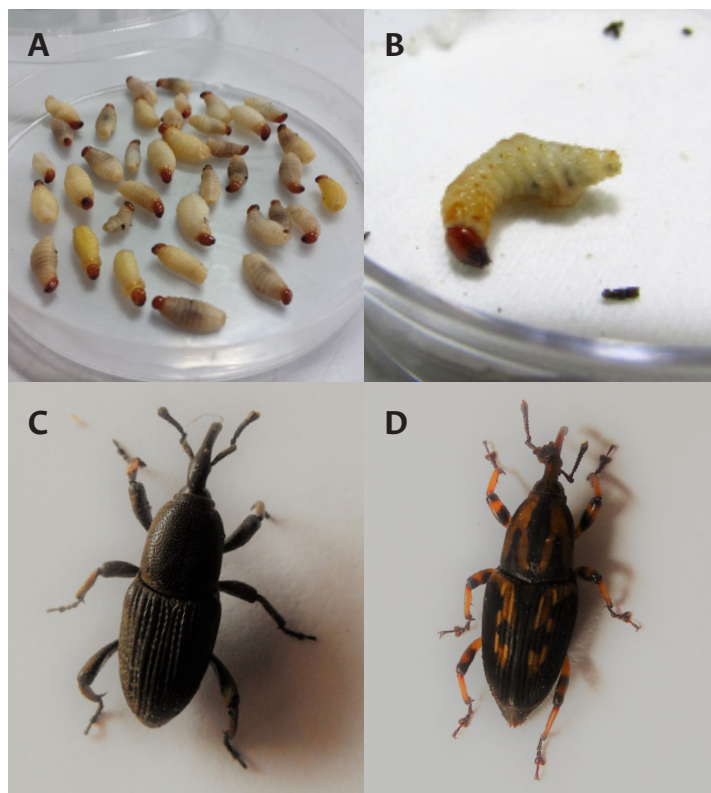


Figura 1. Larvas y adultos de picudos plaga en plátano y banano. A) Larvas de *C. sordidus*. B) Larvas de *M. hemipterus*. C) Adulto de *C. sordidus* (F. Solarte, 2018). D) Adulto de *M. hemipterus* (F. Solarte, 2018).

Los daños pueden ser directos al ocasionar galerías en el rizoma y pseudotallo (figuras 2 y 3), o indirectos por efecto de los microorganismos patógenos que aprovechan las galerías para infectar las plantas (Weissling y Giblin-Davis, 2016).



Figura 2. A) Corte transversal de un rizoma de plátano donde se observan las galerías realizadas por las larvas de los picudos. B) Planta de plátano con volcamiento asociado a daño por picudos.

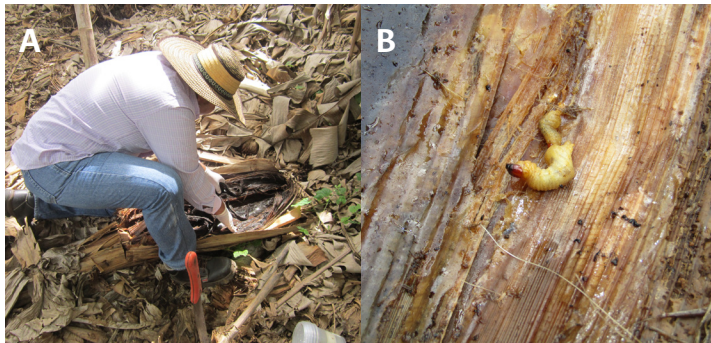


Figura 3. A) Monitoreo para registrar la presencia de picudos en plátano y banano. B) Presencia de larvas al interior del pseudotallo, ocasionando daños en los tejidos vasculares.

NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Los llamados «nematodos entomopatógenos» (NEP) pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (figura 4A). Son animales microscópicos de cuerpo redondo, alargados y que se alimentan de insectos exclusivamente, por lo cual han sido utilizados como agentes de control biológico en el mundo (Koppenhöfer, 2007).

Una de las características más importantes de estas dos familias, para ser llamadas nematodos entomopatógenos, es la capacidad de causar la muerte a sus hospederos (insectos) en 48 horas, gracias a la relación con bacterias (Al-Zaidawi *et al.*, 2019).

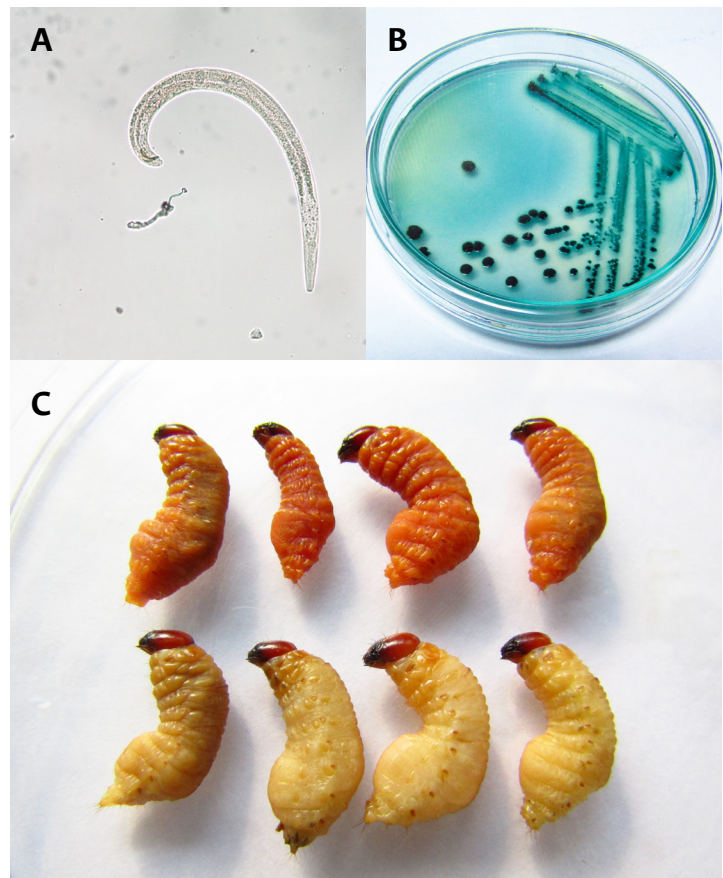


Figura 4. A) Nematodo entomopatógeno (M. Orobio, 2018). B) Bacteria del género *Xenorhabdus* asociada a nematodos entomopatógenos. C) Larvas parasitadas con nematodos entomopatógenos (rojas parasitadas por *Heterorhabditis* sp. y color crema por *Steinernema* sp.)

CICLO DE VIDA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Los nematodos entomopatógenos pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae se asocian con bacterias simbiotas (figura 4B) de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Estos nematodos, de acuerdo con Al-Zaidawi *et al.* (2019), tienen un estadio, que se denomina «juvenil infectivo», que vive en el suelo en busca de insectos. Los nematodos entran al insecto con el fin de parasitarlo a través de aperturas naturales como boca, espiráculos y ano, principalmente. Luego de ello, liberan la bacteria, la cual contamina la hemolinfa y le causa la muerte al insecto por septicemia (figura 4C). Los nematodos se reproducen, se alimentan del cuerpo muerto, se reasocian con la bacteria simbiota y más tarde abandonan el cadáver en búsqueda de nuevos insectos (figura 5).

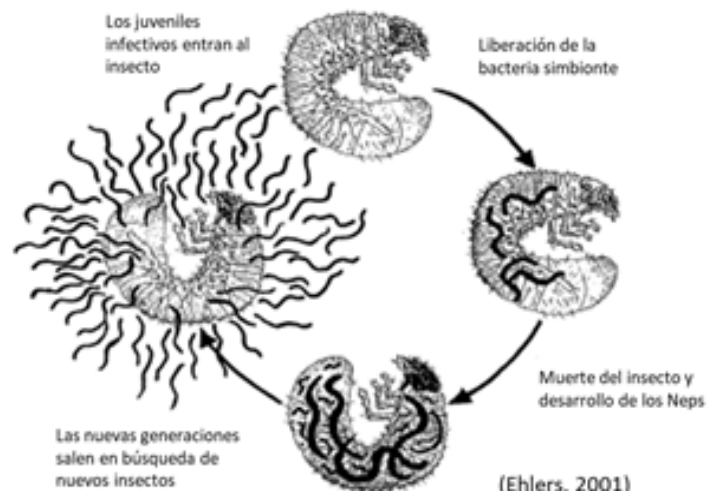


Figura 5. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.
Fuente: Ehlers (2001).

AISLAMIENTO DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

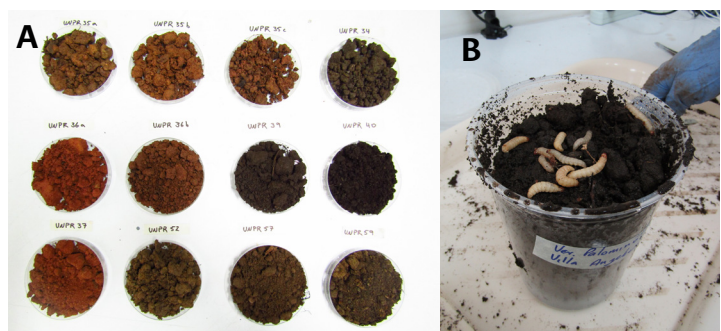
Para el aislamiento de nematodos entomopatógenos, muestras de suelo de aproximadamente 1000 cm³ deben ser tomadas a una profundidad entre 0 y 15 cm, con la ayuda de un barreno, pala o palín (figura 6A). Cada muestra de suelo deberá estar conformada, por lo menos, por tres submuestras, cubriendo un área de 2 m² (figura 6B). Posteriormente, las muestras de suelo deben ser llevadas al laboratorio, teniendo cuidado de que estén protegidas del sol y la pérdida de humedad (Stock *et al.*, 2005).

Figura 6. A) Cultivo de plátano. B) Herramientas utilizadas y muestra compuesta de suelo tomada en cultivo de plátano para el aislamiento de nematodos entomopatógenos.



Como lo sugiere Orozco *et al.* (2014), en el laboratorio las muestras deben procesarse en el menor tiempo posible. Para tal fin, el suelo se deberá disponer en recipientes plásticos de 1000 cm³ (figura 7A). A cada recipiente con suelo se le adicionan 10 larvas de *Galleria mellonella* de quinto instar, volteando el recipiente para que las larvas estén obligadas a ascender por el suelo y los nematodos puedan infectarlas (figura 7B).

Figura 7. A) Muestras de suelo dispuestas en recipientes plásticos para el aislamiento de nematodos entomopatógenos. B) Larvas de *G. mellonella* ubicadas en recipientes plásticos con suelo para el aislamiento de nematodos entomopatógenos.



Después de 4 días, las larvas que presentan síntomas de infección por nematodos se tornan de color crema cuando son infectadas por *Steinernema* y de color marrón oscuro para *Heterorhabditis* (figura 8). Las diferentes tonalidades de marrón para el género *Heterorhabditis* dependen de los días de infección, así como de la especie de nematodo usado (figura 8A-C).

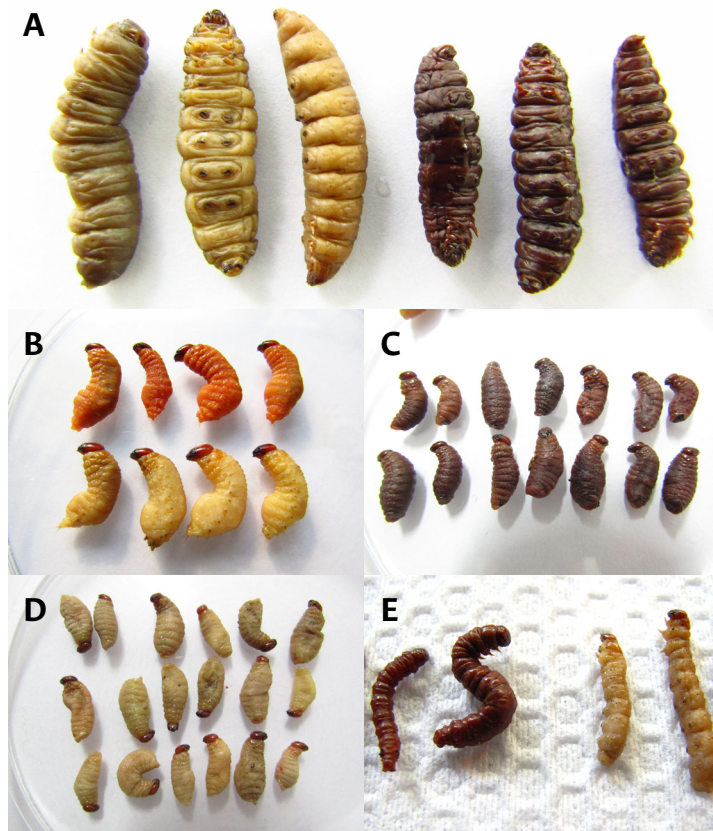


Figura 8. A) Larvas parasitadas por nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. B) Larvas de *M. hemipterus* infectadas por: arriba *Heterorhabditis* sp. UNPS16 y abajo *Steinernema* sp. UNPR52. C) Larvas de *C. sordidus* infectadas por *Heterorhabditis* sp. UNPS19 (color marrón oscuro). D) Larvas de *C. sordidus* infectadas por *Steinernema* sp. UNPR52 (color crema). E) Sintomatología en larvas de *Diatraea sacharalis*, un insecto que también es usado en el trabajo con nematodos.

Posteriormente, las larvas son llevadas a una caja de Petri seca por al menos 5 días y, seguidamente, son puestas en trampas White para la recuperación de los juveniles infectivos (Orozco *et al.*, 2014).

La trampa White consiste en tomar un envase plástico y dentro se ubica una caja Petri invertida. Sobre la trampa se pone un papel filtro o servilleta, haciendo que los extremos de la servilleta sobrepasen la caja de Petri. Posteriormente, se agrega agua destilada estéril en la base del montaje, permitiendo que solo las puntas del papel filtro queden en el

agua. Finalmente, las larvas extraídas de las muestras de suelo e infectadas por NEP se ubican sobre el papel filtro y se espera entre 8 a 20 días hasta la recuperación de los nematodos (figura 9).

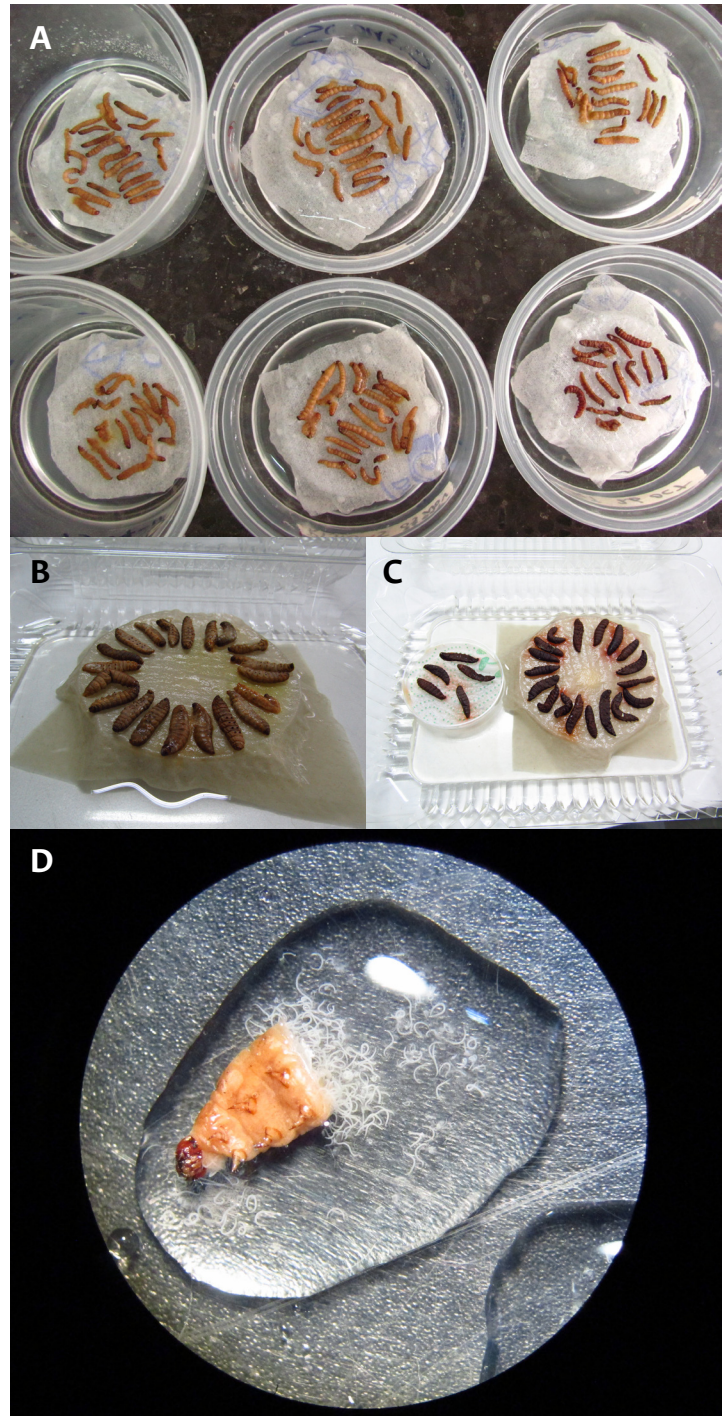


Figura 9. A-C) Trampas White utilizadas para la liberación de nematodos entomopatógenos en larvas parasitadas. D) Corte transversal realizado a una larva infectada por nematodos entomopatógenos, se puede apreciar los nematodos saliendo del cuerpo de la larva.

CONSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Los juveniles infectivos pueden vivir por más de seis meses, en condiciones de almacenamiento, a una temperatura de 8 °C, conservados en espumas estériles o tubos de cultivo plano (figura 10). Si se tiene un aislamiento nuevo, se debe hacer una prueba de 24 horas y revisar la supervivencia de los nematodos.

Una vez se tienen los nematodos en tubos de centrifuga de 50 ml, se procede a contarlos de acuerdo con la metodología propuesta por Stock y Goodrich-Blair (2012). Para tal fin, se debe llevar la suspensión de nematodos a un volumen final deseado, puede ser 40 o 50 ml de agua destilada. Se homogeniza la suspensión agitando el tubo para que los nematodos queden uniformes en todo el volumen (solución madre). Posteriormente, se toman 1000 µL de la solución madre y se depositan en un tubo de centrífuga de 15 ml y se afora a 10 ml. Se homogeniza agitando el tubo (dilución). Seguidamente, se toman 5 gotas de la dilución, cada una de 100 µL. y se procede a contar los nematodos en cada gota (figura 11). Con estos datos se determina el promedio y se debe calcular la concentración de nematodos con la siguiente formula:

$$S = \frac{N * 1(X + 1)}{M}$$

Donde:

N: es el promedio de nematodos por gota.

M: es el número de mililitros de la gota.

X + 1: es la dilución realizada (en este caso 9 + 1).

S: es la concentración (NEP/ml) de la solución madre.



Figura 10. A) Tubos de cultivo plano para almacenamiento de nematodos entomopatógenos. B) Espumas de polietileno para la conservación de los nematodos.

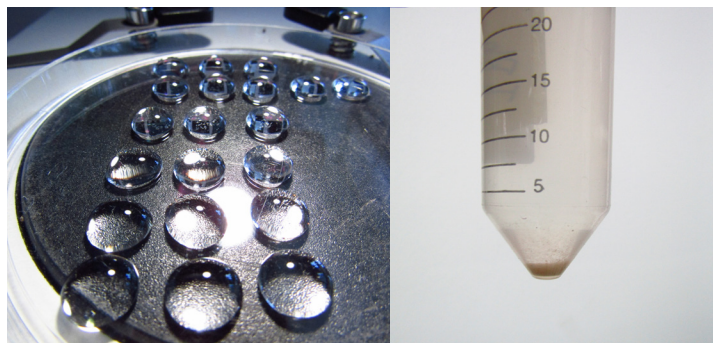


Figura 11. A) Conteo de nematodos en gotas para la preparación de las soluciones. B) Nematodos decantándose en un tubo de centrifuga de 50 ml.

A partir de las diluciones, se debe preparar suspensiones de nematodos de máximo 2000 NEP/ml, para almacenarlos en tubos de cultivo celular planos, ya sea de 50 ml y 250 ml (figura 10A). Además de esto, los nematodos se pueden almacenar en espumas de polipropileno estériles para su larga duración, cortadas en cuadros para su fácil manipulación, agregando 50 ml de la solución hasta que las espumas queden completamente saturadas y haya un exceso de la suspensión (figura 10B).

MUPLICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Una vez se obtienen nematodos puros en el laboratorio, se procede a infectar nuevas larvas. Para esta labor, se deben tener suspensiones en concentraciones conocidas de los nematodos. Para tal fin, en un nuevo recipiente, preferiblemente una caja de Petri, se pone en el fondo un papel filtro o una servilleta, esto para que retenga la humedad y los nematodos puedan desplazarse. Posteriormente, sobre la servilleta se colocan las larvas a infectar, preferiblemente de *Galleria mellonella*. Se humedece un poco el papel y se adicionan los nematodos, teniendo en cuenta que queden 200 JI/larva (figura 12). Es importante que el papel esté húmedo, pero que no tenga exceso de agua, esto se reconoce cuando ya se forma una gota de agua que sale del papel (Stock y Goodrich-Blair, 2012).



Figura 12. A) Larva de *M. hemipterus* lista para infectar. B) Larva de *G. mellonella* en último instar para reproducir los nematodos entomopatógenos.

PROSPECTIVAS PARA EL CONTROL DEL COMPLEJO DE PICUDOS DEL PLÁTANO Y BANANO CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

La Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, especialmente el grupo de investigación en Diversidad Biológica, a partir de los resultados del proyecto de investigación Desarrollo de tecnologías innovadoras para el manejo integrado de plagas y enfermedades limitantes de plátano y banano en el Valle del Cauca, evidenció la alta susceptibilidad de las larvas de los picudos del plátano y banano a aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos.

Actualmente, se cuenta con más de 10 aislamientos de nematodos entomopatógenos, los cuales se han sido seleccionados por su capacidad para matar insectos del complejo de picudos asociados a cultivos de plátano y banano. Estos nematodos entomopatógenos se encuentran en proceso de identificación morfológica y molecular.

Las larvas de los picudos realizan galerías en el cormo y en el pseudotallo, donde desarrollan todo su estado larval y realizan la pupa. El pseudotallo, formado por calcetas, y el cormo proveen un ambiente húmedo por los cuales los nematodos pueden moverse y encontrar las larvas de los picudos, como se observó en ensayos iniciales de campo. En ese sentido, es necesario que se lleven a cabo otras investigaciones encaminadas a establecer metodologías para la aplicación de estos agentes de control biológico de picudos del plátano y banano en condiciones de campo, lo mismo que estudios relacionados con el desplazamiento de los nematodos entomopatógenos.

CONCLUSIONES

En algunos sistemas de producción de plátano y banano existen poblaciones de nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Estos nematodos son eficientes biocontroladores de insectos plaga en cultivos agrícolas.

Diferentes aislamientos de nematodos entomopatógenos, provenientes de sistemas de producción de musáceas y evaluados por su patogenicidad en condiciones controladas, causan la muerte a larvas de *C. sordidus* y *M. hemipterus*, con lo cual este tipo de nematodos tienen potencial para su uso en el control de picudos de plátano y banano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación (FCTel) del Sistema General de Regalías (SGR), con el apoyo de la Gobernación del Valle del Cauca, por la financiación del proyecto Desarrollo de tecnologías innovadoras para el manejo integrado de plagas y enfermedades limitantes de plátano y banano en el Valle del Cauca.

A las instituciones Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Instituto Nacional Agropecuario (ICA), Universidad del Valle y, especialmente, a los investigadores que ayudaron en la formulación del proyecto: la doctora Ana Milena Caicedo, la doctora Ana Milena Varela, el doctor James Montoya, la doctora Elizabeth Álvarez y su equipo de trabajo. Damos gracias a los productores de plátano y banano de los municipios de Argelia, Caicedonia, Palmira, Sevilla, Buenaventura, El Cairo, Yotoco y Obando (Valle del Cauca).

A su vez, agradecemos a los miembros del proyecto, conformado por estudiantes, docentes y personal administrativo, quienes permitieron, a través del trabajo de campo y laboratorio, y mediante asesorías y trámites administrativos, generar resultados de gran importancia para los productores y la comunidades académica y científica.

A los profesores Héctor Fabio Ramos Rodríguez y Herney Darío Vásquez Amariles, adscritos a la Universidad Nacional de Colombia, agradecemos por el acompañamiento realizado al proyecto durante su formulación y ejecución, y por sus importantes aportes como revisores del material bibliográfico derivado del proyecto.

A Edilma Vélez Sinisterra y Daniela Velásquez Ramírez, damos gracias por apoyar el proyecto en su ejecución administrativa, labor importante que ha permitido llevar a feliz término el cumplimiento de los objetivos. Por último, damos gracias a Deisy Johanna Guerrero por su apoyo en la supervisión técnica del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, J. y Jiménez, Y. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp.). *Medidas para la temporada invernal*. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).
- Al-Zaidawi, J., Karimi, J. y Mahdikhani, E. (2019). Molecular characterizations of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Oscheius myriophilus* from Iraq. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(38), 1-9.
- Ehlers, R. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56, 623-633.
- Koppenhöfer, A. (2007). Nematodes. En L. Lacey y H. Kaya (eds.) *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pest* (pp. 249-264). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Muñoz-Ruiz, C. (2007). Fluctuación poblacional del picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) del plátano (*Musa* AAB) en San Carlos, Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 20(1), 24-41.
- Orozco, R., Lee, M. y Stock, S. (2014). Soil Sampling and Isolation of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*, 89, 1-8.
- Sepúlveda-Cano, P. A. y Rubio-Gómez, J. D. (2009). Especies de *Dryophthorinae* (Coleóptera: Curculionidae) asociadas a plátano y banano (*Musa* spp.) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 49-72.

- Stock, S., Caicedo, A. y Calatayud, P. 2005. *Rhabditis (Oscheius) colombiana* n. sp. (Nemátoda: Rhabditidae), a necromenic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemíptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. *Nematology*, 7(3), 363-373.
- Stock S. P. y Goodrich-Blair H. (2012). Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. En L. A. Lacey (ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate pathology* (pp. 375-425). Elsevier Press.
- Vallejo, L., Sánchez, R. y Salgado, M. (2007). Redescrición del adulto y descripción de los estados inmaduros de *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleóptera: Curculionidae), el picudo negro barrenador del plátano en Colombia. *Boletín científico-Centro de Museos-Museo de Historia Natural*, 11, 361-375.
- Weissling T. J. y Giblin-Davis R. M. (2016). Silky Cane Weevil, *Metamasius hemipterus sericeus* (Oliver) (Insecta: Coleóptera: Dryophthorinae). <https://n9.cl/hdyza>

Nematodos entomopatógenos: una alternativa para el control de los picudos del plátano

Se terminó de imprimir en diciembre de 2020. Compuesto en caracteres Ancizar Sans e impreso en papel bond de 90 g para las páginas internas y propalmate de 240 g para la portada y contraportada.

Impreso en Palmira, Colombia.

