

## BIOPROSPECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO *Heterorhabditis* EN PANAMÁ<sup>1</sup>

**Eric M. Candanedo-Lay<sup>2</sup>; Gregorio Aranda-Caballero<sup>3</sup>;  
Alci Cabezón-Puchicama<sup>4</sup>; Luisa Daniela Reina-Peña<sup>5</sup>**

### RESUMEN

El Laboratorio de Nematología (NEMALAB) inició en el 2014 un programa para la bioprospección de nematodos entomopatógenos (NEP), principalmente en las áreas de influencia del Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOr) del IDIAP, en las provincias de Colón, Darién y Panamá. Para los muestreos de suelos de las prospecciones se dio prioridad a fincas o sitios en donde no se aplican plaguicidas. Al mismo tiempo, se estableció un Programa de Producción y Crianza de larvas sanas de la polilla mayor de los apiarios, *Galleria mellonella*, en una de tres dietas artificiales evaluadas con anticipación, para multiplicación y mantenimiento *in vivo* de las cepas nativas de NEP que se hallaran. También se estableció un Banco de Cepas Nativas de NEP para depositar y mantener las cepas encontradas, para usos futuros en estudios taxonómicos para identificar las especies de las cepas depositadas (por morfometría y biología molecular) y la realización de pruebas de eficacia de las cepas en el control biológico de plagas insectiles. Se han aislado 16 cepas nativas de NEP (NEMALAB 1H a NEMALAB 16H) identificadas por taxonomía convencional (morfometría) bajo microscopio compuesto de luz, dentro del género *Heterorhabditis* (8 de Colón, 5 de Darién, 1 de Panamá, 1 de Coclé y 1 de Panamá Oeste), en la rizosfera de 12 cultivos (ají dulce, cacao, café Robusta, cítricos, guineo Patriota, jengibre, maíz, papaya, piña, plátano Cuerno Rosado, yuca y toronja). Cada cepa fue geo etiquetada en coordenadas UTM y se registró la altitud del hallazgo en msnm, para referencias futuras. Las cepas con su bacteria simbiote incorporada internamente, *Photorhabdus* spp., se mantienen en el cepario en agua destilada. Para mantener las cepas vivas, activas y patogénicas estas se refrescan mensualmente infectando larvas sanas de *G. mellonella* y recuperando especímenes del tercer estadio juvenil infectivo (J3), que emergen de los cadáveres de las larvas infectadas y muertas colocadas en “trampas de White”.

**Palabras claves:** Muestreo de rizosfera, *Galleria mellonella*, dieta artificial, pruebas de eficacia, banco de cepas.

<sup>1</sup> Recepción: 15 de enero de 2019. Aceptación: 30 de octubre de 2019. IDIAP.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOr). Ph.D. en Nematología. e-mail: [emcandanedo@gmail.com](mailto:emcandanedo@gmail.com)

<sup>3</sup> IDIAP. CIAOr. Lic. en Biología. e-mail: [garandacaballero9@gmail.com](mailto:garandacaballero9@gmail.com)

<sup>4</sup> IDIAP. CIAOr. Bachiller. e-mail: [alsicabe4@gmail.com](mailto:alsicabe4@gmail.com)

<sup>5</sup> IDIAP. CIAOr. Lic. en Adm. Empr. Agrop. e-mail: [luisa16.lpa@gmail.com](mailto:luisa16.lpa@gmail.com)



## BIOPROSPECTION AND CONSERVATION OF NATIVE CEPAS OF THE ENTOMOAGRAPHIC NEMATOD *Heterorhabditis* IN PANAMA

### ABSTRACT

In the year 2014 the Nematology Lab (NEMALAB) established a program for bioprospecting entomopathogenic nematodes (EPN's), mainly in the areas of influence of IDIAP's Oriental Agricultural Research Center, at Colon, Darien and Panama provinces. For prospection, soil samples were collected primarily from farms or sites where pesticides are not applied. At the same time, a Program for the Production and Rearing of healthy larvae of apiary's greater moth, *Galleria mellonella*, was established in one of three previously evaluated artificial diets, for the multiplication and *in vivo* maintenance of the native EPN strains. A Native Strains Bank was also established for depositing and maintaining found strains, for future uses in taxonomic studies for species identification of deposited strains (by morphometry and molecular biology) and the making of efficacy trials for biological control of insect pests. To November 2018 16 EPN's native strains have been isolated (NEMALAB 1H to NEMALAB 16H) identified by conventional taxonomy (morphometry) under a compound microscope, within the genus *Heterorhabditis* (8 from Colon, 5 from Darien, 1 from Panama, 1 from Cocolé and 1 from West Panama), in the rhizosphere of 12 crops (sweet pepper, cocoa, Robusta coffee, citrus, Patriota guinea, ginger, corn, papaya, pineapple, Cuerno Rosado plantain, yucca, and grapefruit). Each strain was geo-labeled in UTM coordinates and its altitude was registered in masl, for future references. The strains and their internally incorporated symbiont bacterium, *Photorhabdus* spp., were maintained at the strains bank in distilled water. To maintain them alive, active and pathogenic they were monthly refreshed by infecting healthy larvae of *G. mellonella* and recovering specimens of their third infective juvenile stage (J3) as they emerge from the cadavers of the infected and dead larvae, placed on top of "White traps".

**Key words:** Sampling in rhizosphere, *Galleria mellonella*, artificial diets, efficacy trials, strains bank.

### INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades de los cultivos están entre las limitantes más serias de la producción agrícola en Panamá. Su presencia es inevitable e induce a la aplicación de plaguicidas químicos como principal herramienta de los productores para su manejo y control. El uso indiscriminado de estos productos de la síntesis química, además de incrementar el costo de producción, contamina los agroecosistemas y sus cuencas hidrográficas y puede provocar la aparición de poblaciones de plagas cada vez más resistentes, entre estas las plagas insectiles. Al disminuir la eficacia, el productor tiende a incrementar las dosis de aplicación de estos agroquímicos, con el objetivo de proteger su



©2020 Ciencia Agropecuaria es desarrollada en el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Para más información escribir a [cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa](mailto:cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa)

inversión, escapando o controlando el daño. Esto crea un círculo vicioso que, con frecuencia, termina con la pérdida de rentabilidad de los cultivos y el abandono de la actividad por los productores. Lo último tiene serias consecuencias no solo para el productor si no para los trabajadores agrícolas y sus familias que quedan sin fuentes de ingresos, para las empresas agropecuarias que ven disminuida su clientela y para la sociedad en su conjunto. Consciente de esta problemática, el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) lleva años privilegiando la investigación agropecuaria orientada a la generación de tecnologías amigables a los agroecosistemas. Estas van desde tácticas muy específicas como la resistencia genética, el control etológico y el control biológico, entre otras, hasta estrategias muy amplias, con enfoque holístico, como el Manejo Integrado de Plagas (MIP) y el Manejo Integral de Cultivos (MIC), que permiten producir alimentos de manera amigable y sostenible en el tiempo. Las tácticas específicas pueden luego integrarse a nuevas estrategias de MIC y MIP, luego de su validación y prueba. Una de ellas es el control biológico y, dentro de este, el de plagas insectiles clave con nematodos entomopatógenos. Estos nematodos son utilizados en muchos países por la amplia gama de insectos que les sirven de hospederos, su alta eficacia biológica, su bajo costo de producción (comparados con los agroquímicos) y de aplicación, así como por su inocuidad para el ser humano y los animales domésticos. Portan una bacteria patógena que es la que mata los insectos y con la que mantienen una *simbiosis mutualista* de la que ambos se benefician: los nematodos entomopatógenos proveen a la bacteria simbiote el transporte y la entrada al hemocele de los insectos, donde la liberan; la bacteria simbiote se multiplica, mata al insecto por septicemia y los nematodos se alimentan de la bacteria y de los *detritus* o detritos producidos por la descomposición de los cadáveres de los insectos causada por la bacteria. Sin embargo, lo más conveniente es utilizar cepas nativas, mejor adaptadas a las condiciones agroclimáticas locales, que cepas importadas de otros países que los comercializan a precios más altos que las producidas localmente. El IDIAP evaluó preliminarmente estos nematodos en la década de 1990, en el marco del PRECODEPA (Programa Regional Cooperativo de Papa) y desde el año 2014 se ha retomado esta línea de investigación a través de un proyecto específico y a través de una Tesis de Maestría de la Universidad Interamericana de Panamá, con la colaboración del IDIAP (IDIAP, 2014; Morales, 2016).



El objetivo central de este trabajo era la búsqueda y mantenimiento de cepas nativas de nematodos entomopatógenos, con énfasis en las áreas de influencia del Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOr) del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), en las provincias de Panamá (Este), Colón y Darién para, posteriormente, identificar las especies y evaluar su eficacia biológica sobre distintas plagas insectiles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Bioprospecciones

Entre 2014 y 2018 se realizaron más de 35 prospecciones de cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP), principalmente en las provincias de Panamá (Este), Colón y Darién, áreas correspondientes al Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOR), incluyendo algunas en las provincias de Panamá Oeste y Coclé. Para las bioprospecciones se seleccionaron, preferiblemente pero no exclusivamente, fincas en las que no se aplican plaguicidas de la síntesis química. Entre los años 2014 y 2015 las bioprospecciones consistían en la recolección de cadáveres de larvas de plagas insectiles dispersas sobre la superficie del suelo y a profundidades entre 15 cm y 20 cm; entre 2015 y 2018, en la recolección de muestras compuestas de suelo de la rizosfera de distintos cultivos a profundidades similares. Por separado, se recolectaron muestras compuestas de suelo de la rizosfera de diversos cultivos y, con ayuda de un GPS, se registraba la ubicación geográfica en coordenadas UTM y la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm) de cada una, para poder reubicar, posteriormente, aquellas en las que se encontrara una cepa nativa de nematodo entomopatógeno (NEP).

### Captura de las cepas nativas de NEP con un insecto trampa

La bioprospección por el método de recolección de cadáveres se suspendió en el 2015 por ser muy poco eficaces y difíciles de implementar y se reemplazó por el muestreo de suelos. En el Laboratorio de Nematología del CIAOR (NEMALAB), en Tanara, El Naranjal, Chepo, las muestras de suelo eran homogenizadas y colocadas en tres u ocho envases plásticos con tapa, según la cantidad de suelo recolectada y la disponibilidad de larvas de la “polilla mayor de los apiarios”, *Galleria mellonella*, producidas en dieta artificial en el laboratorio y utilizadas como “insecto trampa” para la captura de NEP. En cada



envase se colocaban unos 400 cm<sup>3</sup> del suelo dejando un espacio libre, para el intercambio de oxígeno y CO<sub>2</sub>, entre la superficie del suelo y la tapa del envase.

Sobre el suelo se depositaron de tres a seis larvas vivas y sanas de *G. mellonella* y se colocó la tapa sobre la que, previamente, se habían hecho una serie de pequeños hoyos con un alfiler caliente, para permitir la entrada y salida de gases. Las larvas de *G. mellonella* entran en el suelo buscando oscuridad y, en las muestras positivas, los juveniles infectivos J3 (juveniles dauer) del NEP las buscan y, al encontrarlas, penetran en su hemocele por las aberturas naturales (boca, espiráculos y ano). El género de NEP *Heterorhabditis*, adicionalmente, puede penetrar a través del tegumento intersegmental de las larvas insectiles, con la ayuda de un diente dorsal que poseen en su región labial (Figura 1).



**Figura 1. Captura de nematodos entomopatógenos (NEP) en muestras de suelo con el insecto trampa, *Galleria mellonella*.**

### **Extracción de las cepas nativas de NEP**

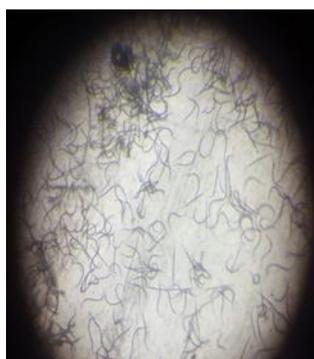
Dos a cuatro días después de colocar las larvas de *G. mellonella* sobre el suelo, las que son infectadas por los J3 del NEP experimentan un cambio en su coloración, reducen su metabolismo y mueren por septicemia (infección generalizada) de 24 a 48 horas después de la introducción de la bacteria patógena simbiote, *Photorhabdus* sp., en el caso del género de NEP *Heterorhabditis*. Una o dos larvas son abiertas con un bisturí y observadas bajo un estereoscopio, recolectando por separado hembras hermafroditas (primera generación) y hembras anfimícticas y machos (segunda generación) que se



conservan en formalina al 5% para su posterior identificación convencional (morfometría) a nivel de especies, utilizando claves de identificación (Figura 4). La identificación convencional será confirmada por biología molecular. El resto de las larvas muertas se enjuagan profusamente en agua destilada y se colocan en “trampas de White” construidas con envases de boca ancha de 300 a 400 ml de capacidad y fondo plano sobre el que se coloca un fondo de plato Petri pequeño (5 cm de diámetro) o un dispositivo similar, invertido (Figura 2). La superficie plana expuesta del Petri invertido se cubre con papel filtro cuyos bordes lleguen hasta el fondo del envase grande y se vierte agua destilada o del grifo, sin rebasar la superficie del plato Petri. El papel filtro se humedece completamente por capilaridad y sobre el Petri se colocan todas las larvas muertas de *G. mellonella*, a razón de una trampa de White por cada envase con suelo (White, 1927). De seis a ocho días después (9 a 12 días después de haber colocado las larvas sanas de la polilla sobre el suelo), consumido completamente el cuerpo de la larva de *G. mellonella*, miles de especímenes de una nueva generación de juveniles infectivos dauer (J3) abandona el cadáver por carencia de alimento y, por gravedad, se precipitan al fondo del envase grande (Figura 3), donde son recolectados (en la naturaleza, pasan al suelo en busca de nuevos hospederos). A cada nueva cepa nativa se le asigna un código de identificación provisional y se deposita en el cepario o Banco de Cepas Nativas.



**Figura 2. Larvas de *Galleria mellonella* en trampas de White.**



**Figura 3. Juveniles infectivos dauer.**



**Figura 4. Hembras hermafroditas, hembras anfimícticas y machos en el hemocele de una larva *G. mellonella*.**



## Conservación e incremento de las cepas nativas almacenadas

Los juveniles infectivos J3 de las nuevas cepas, portando la bacteria simbiote fresca, adquirida en el cadáver insectil abandonado, no se alimentan y se mantienen en el cepario o Banco de Cepas Nativas, en agua destilada. Estos juveniles dauer pueden mantenerse vivos durante semanas, sin alimentarse, pues poseen un metabolismo muy reducido. Mensualmente, se realizan reinfecciones de las cepas nativas almacenadas en platos Petri con el fondo cubierto con papel de filtro, sobre el que se colocan larvas sanas de *G. mellonella* que reciben un inóculo de la cepa que se desea refrescar. De este modo se conservan e incrementan las poblaciones de las cepas nativas encontradas para, posteriormente, identificar las especies por taxonomía convencional y biología molecular. También para la realización de pruebas de eficacia biológica sobre distintas plagas insectiles claves en diversos cultivos de importancia económica en Panamá.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de bioprospección por recolección de cadáveres de plagas insectiles era poco eficiente y muy laborioso para implementar. Con frecuencia no se encontraban cadáveres de las larvas insectiles o, cuando se encontraban, podían no contener juveniles infectivos de NEP, ya que los insectos habían muerto por otras causas o porque ya los NEP habían abandonado el cadáver insectil, totalmente descompuesto, y estaban en el suelo. No fue posible hallar cepas nativas de NEP con este método tras un año de estarlo implementando.

Las bioprospecciones por recolección de muestras compuestas de suelos en la rizosfera de los cultivos dieron resultados positivos desde el inicio de su implementación. Luego de múltiples bioprospecciones, principalmente en las áreas de influencia del Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOr), se hallaron 16 cepas nativas de nematodos entomopatógenos, todas identificadas dentro del género *Heterorhabditis* (Cuadro 1). La identificación de las especies de cada cepa está en progreso. Las mismas están el cepario del Laboratorio de Nematología (NEMALAB) del CIAOr donde se mantienen en suspensión en agua destilada y se conservan vivas mediante reinfecciones mensuales en larvas de la polilla mayor de los apiarios, *Galleria mellonella*. La conservación *in vivo* en larvas de la polilla también permite que la bacteria simbiote se mantenga viva y patogénica.



Las cepas se denominaron provisionalmente, a medida que eran halladas, NEMALAB 1 hasta NEMALAB 16 (Cuadro 1). Se incluye información adicional como la rizosfera de los cultivos en que fueron encontradas, las coordenadas UTM de cada una (para referencia futura o recuperación), la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm), las comunidades y provincias de los hallazgos y los productores en cuyas fincas se realizaron las bioprospecciones de los hallazgos. La identificación del género en que se ubican las cepas nativas encontradas se realizó por taxonomía convencional (morfometría), utilizando distintas claves de identificación como Nguyen and Smart, 1995; Nguyen, 2007; Nguyen and Hunt, 2007; Malan et al., 2011; Hunt and Nguyen, 2016.

**Cuadro 1. Cepas nativas del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* spp. halladas en múltiples bioprospecciones, 2014 – 2018.**

Código de entrada en el CEPARIO	Cultivo	Coordenadas UTM	Altitud (msnm)	Comunidad	Provincia	Productor
NEMALAB 1H	Cacao	17 P 0648419, 1026745	164	Quebrada Ancha	Colón	Esperanza Mesa
NEMALAB 2H	Cacao	17 P 0656210, 1031239	135	Lago Alajuela	Colón	Manuel Ureña
NEMALAB 3H	Café Robusta	17 P 0656200, 1031207	161	Lago Alajuela	Colón	Manuel Ureña
NEMALAB 4H	Cítricos	17 P 0656116, 1031118	100	Lago Alajuela	Colón	Manuel Ureña
NEMALAB 5H	Guineo Patriota	17 P 0656200, 1031207	161	Lago Alajuela	Colón	Manuel Ureña
NEMALAB 6H	Cacao	17 P 0684039, 1007241	21	Cabras	Panamá	Onesio Martínez
NEMALAB 7H	Maíz	17 P 0554058, 0932965	34	Boca Toma, Natá	Coclé	Abilio Ramos
NEMALAB 8H	Piña	17 P 0622633, 0992501	133	Las Zanguengas	Pmá. Oeste	Cabo Zarso, lote 3, parcela 31
NEMALAB 9H	Papaya	18P 0179660, 0933384	61	Sansoncito	Darién	Abenicio Vásquez
NEMALAB 10H	Piña	18 P 0179656, 0933383	63	Sansioncito	Darién	Abenicio Vásquez
NEMALAB 11H	Plátano Cuerno Rosado	18 P 0179635, 0933384	58	Sansioncito	Darién	Abenicio Vásquez
NEMALAB 12H	Yuca	18 P 0179619, 0933377	45	Sansioncito	Darién	Abenicio Vásquez
NEMALAB 13H	Jengibre	17 P 0648318, 1026662	129	Q Ancha, Salamanca	Colón	Esperanza Meza
NEMALAB 14H	Toronja	17 P 0648320, 1026664	134	Q Ancha, Salamanca	Colón	Esperanza Meza
NEMALAB 15H	Ají Dulce	18 P 0181455, 0932142	69	Sansoncito	Darién	Nicolás Bravo
NEMALAB 16H	Café Robusta	17 P 0642846, 1026750	84	Buena Vista	Colón	Finca del IDIAP

La cabeza, vulva y cola de una hembra hermafrodita se observa en la Figura 5, mientras que en la Figura 6, el macho (cabeza y cola); el juvenil infectivo dauer (J3) en la Figura 7. Son microfotografías de la cepa nativa NEMALAB 1H (la primera cepa hallada), encontrada en la rizosfera de un cultivo de cacao (*Theobroma cacao*), creciendo a 164 msnm, en la finca del señor Esperanza Meza, en Quebrada Ancha, distrito de Salamanca, provincia Colón.



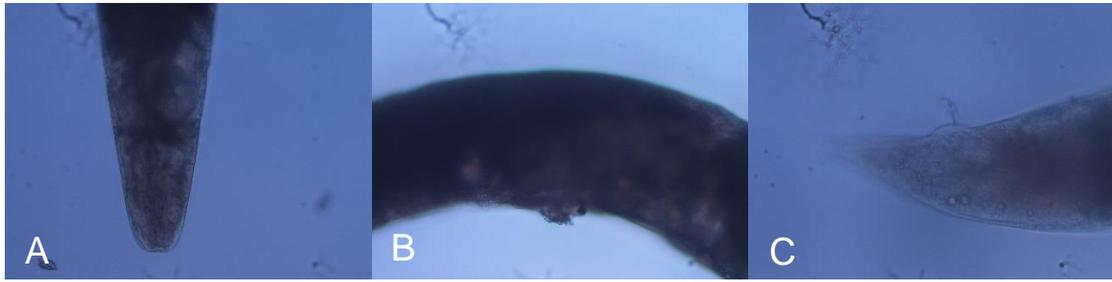


Figura 5. Cabeza (A), vulva (B) y cola de hembra hermafrodita de *Heterorhabditis* spp. (C)

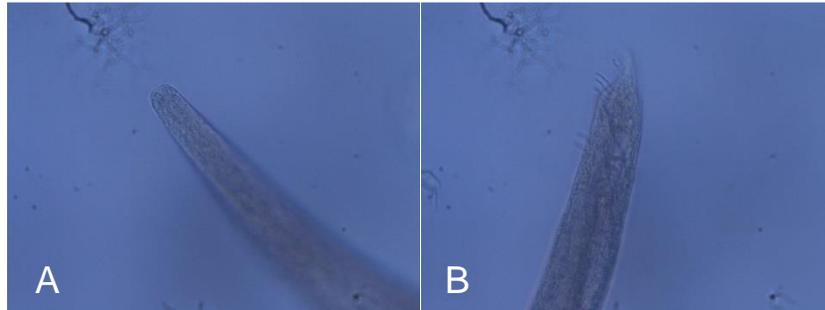


Figura 6. Cabeza (A) y cola con espícula y costillas de la bursa (B), macho, *Heterorhabditis* sp. (40X).

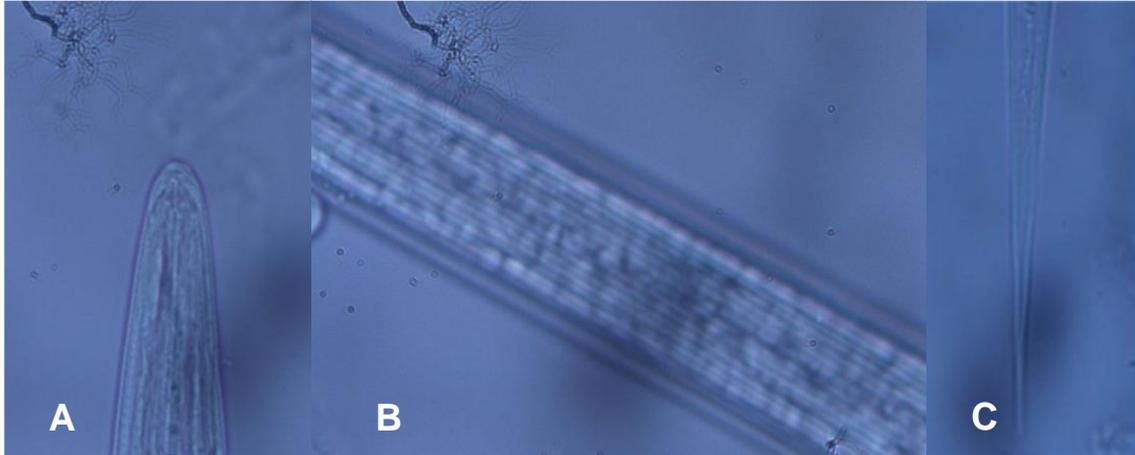


Figura 7. Cabeza con diente dorsal (A), campo lateral (B) y cola de juvenil infectivo dauer (C) de *Heterorhabditis* sp. (100X).



## CONCLUSIONES

- El método de bioprospección de cepas nativas de nematodos entomopatógenos por muestreo de suelos de la rizosfera de diversos cultivos (años 2015 - 2018) fue más eficaz para la captura de juveniles infectivos J3 (juveniles dauer) que el de la recolección de cadáveres de larvas insectiles utilizado inicialmente (año 2014 - 2015).
- En las áreas muestreadas del CIAOR existen condiciones agroclimatológicas que favorecen la predominancia del género *Heterorhabditis* sobre el género *Steinernema*, del cual no se hallaron cepas nativas en más de treinta bioprospecciones realizadas que incluyeron las provincias de Panamá (Este), Colón y Darién.
- Queda pendiente la identificación de especies de las cepas nativas halladas por taxonomía convencional y por biología molecular (ADN), así como las pruebas de su eficacia en laboratorio y campo sobre plagas insectiles de distintos cultivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá). 2014. Prospección, identificación, crianza y eficacia biológica de cepas nativas de nematodos entomopatógenos y microorganismos benéficos para el control biológico de plagas insectiles y patógenos, en zonas de producción agrícola de Panamá Este y Colón. IDIAP.
- Hunt, D.J. and K.B. Nguyen (Eds). 2016. Advances in Entomopathogenic Nematode Taxonomy and Phylogeny. Nematology Monographs and Perspectives 12 (Series Editors: Hunt, D. J. & Perry, R. N.). Brill, Leiden - Boston.
- Malan, A.P., R. Knoetza and S.D. Moore. 2011. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their biocontrol potential against false codling moth. Invertebrate Pathology 108: 115 - 125.
- Morales, P. 2016. Localización e Identificación de Cepas Nativas de Nematodos Entomopatógenos en Zonas de Producción Agrícola de Panamá. Tesis para optar al grado de Maestría en Gestión Ambiental. Universidad Latina de Panamá.



Nguyen, K.B. 2007. Methodology, morphology and identification. In: Nguyen, K.B. and Hunt, D.J. (Eds). 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Nematology Monographs and Perspectives 5 (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Brill, Leiden - Boston, p. 59 - 119.

Nguyen, K.B. and D.J. Hunt (Eds.). 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Nematology Monographs and Perspectives 5 (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Brill, Leiden - Boston.

Nguyen, K.B. and G.C. Smart Jr. 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). Nematology 27: 206-212.

White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science 66: 302 - 303.

