

IV Congreso Ecuatoriano de la Papa, Guaranda 2011

# Manejo de Nematodos Entomopatógenos en Laboratorio



C. Castillo, P. Gallegos, Marcia Oña  
Departamento Nacional de Protección Vegetal  
EESC-INIAP



# Contenido de la presentación



- **Introducción**
- **Nematodos entomopatógenos**
  - *Heterorhabditis* y *Steinernema*
- **Ciclo de vida**
- **Aislamiento de NEPs desde el suelo**
- **Recuperación de NEPs de larvas de *Galleria mellonella***
- **Almacenamiento**
- **Determinación del número de JIs de una suspensión**
- **Renovación**
- **Multiplicación**



# Introducción



- **Enemigos naturales**
- **Poblaciones bajas**
- **El conocimiento de métodos**
- **Parásitos obligados**
- **Forman mutualismo (Septicemia)**

# Nematodos entomopatógenos

---

## *Heterorhabditis*



- 8 especies
- Se desplazan a través del suelo buscando al huésped

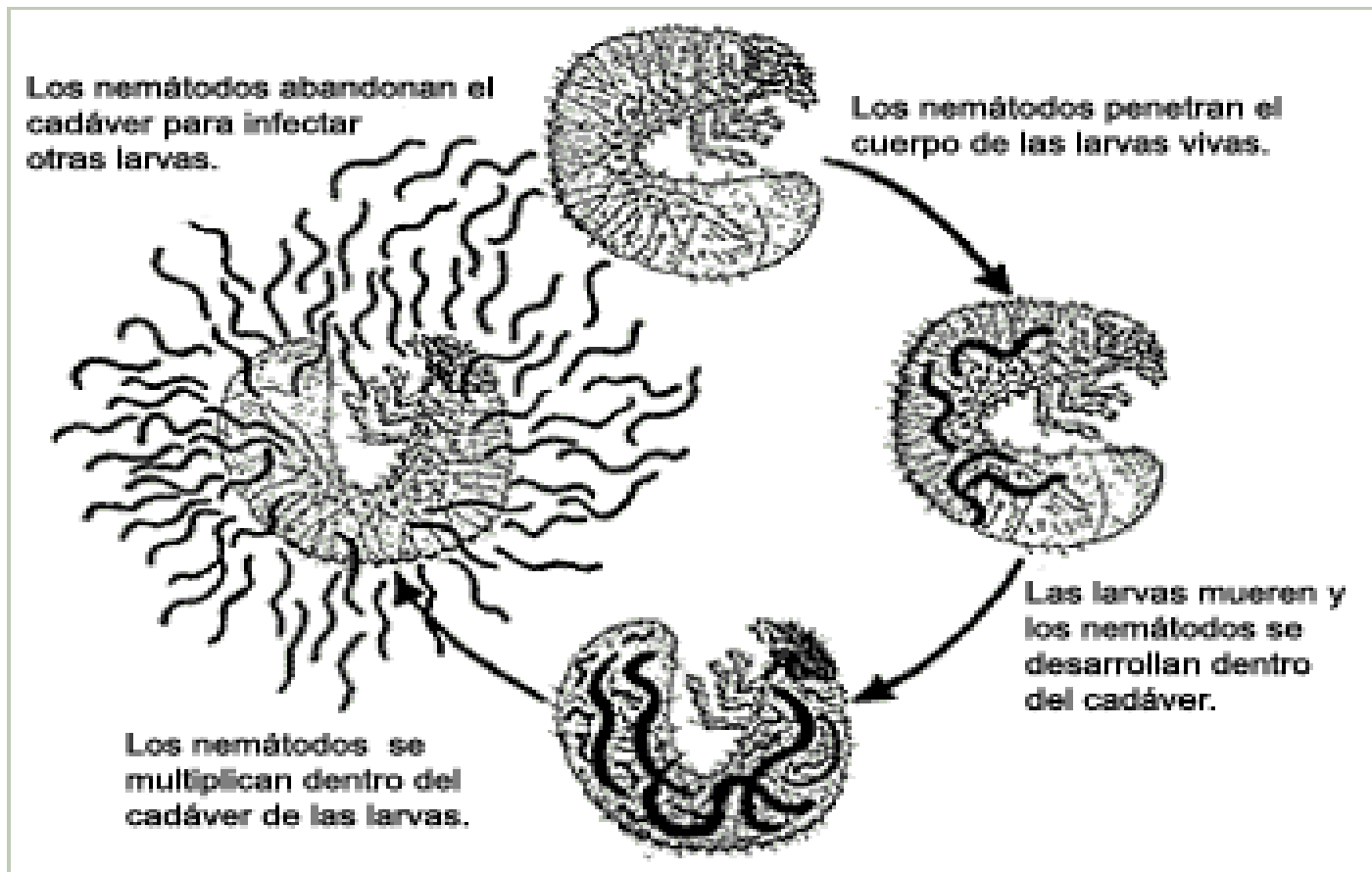


## *Steinernema*



- 30 especies
- Permanecen en la superficie del suelo esperando al huésped

# Ciclo de vida de los NEPs

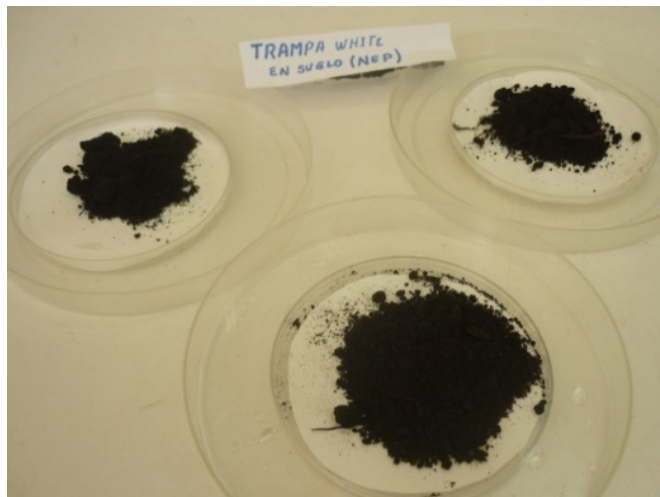


# Aislamiento de NEPs desde el suelo



- Tomar varias muestras del suelo
- Utilizar trampas White o insectos trampa
- Postulados de Koch

**Trampas White**



**Insectos trampa**



# Recuperación de NEPs de larvas de *Galleria mellonella*



**Trampa White**

- Trasladar con mucho cuidado.
- Mantener las trampas cubiertas con un plástico negro (Evaporación de agua).
- Se movilizan por el papel húmedo hasta llegar al agua del plato Petri.
- Los NEPs empiezan a salir luego de 6 días en *Steinernema* y 10 días en *Heterorhabditis*.

# Recuperación de NEPs de larvas de *Galleria mellonella* (continuación)



## Decantación

- Recolectar la suspensión de los NEPs.
- Renovar el agua en la trampa en cada cosecha (3 cosechas cada cuatro días).
- Hay de 15000 a 30000 JIs de NEPs por larva de *G. mellonella*.
- Trasladar los NEPs a recipientes con agua destilada.
- Colectar los NEPs para su almacenamiento



# Almacenamiento de NEPs



## En cajas Petri o recipientes plásticos



- Emplear cajas Petri de 15cm de diámetro que puedan contener una delgada lámina de agua.
- Agregar dos gotas de bicarbonato al 1%
- Poner de 7200 a 16500 NEPs en 30ml de agua destilada.
- Refrigerar a 4°C.
- Revisar el nivel de agua.
- Renovar los NEPs cada 3 meses.

# Almacenamiento de NEPs

(continuación)

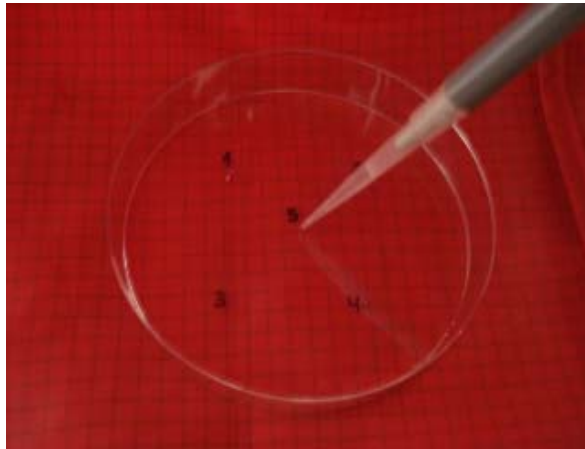


## En esponjas dentro de fundas plásticas

- Cortar esponjas en tiras de 1x1x5 cm
- Colocarlas 15 tiras de esponja en una funda plástica de 15x15cm
- Poner 120ml de la suspensión de agua con los NEPs a una concentración de 68000 NEPs



# Determinación del número de juveniles infectivos de una suspensión

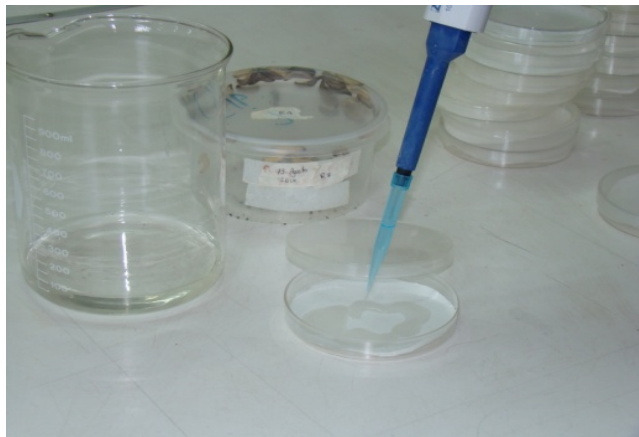


- Extraer los NEPs de las trampas White.
- Extraer la mayor cantidad del agua del último lavado y aforar a 300ml.
- Tomar 10 $\mu$ l (5 repeticiones) y colocar en una caja Petri con cuadrantes.
- Contar los NEPs contenidos en los 10  $\mu$ l de las 5 repeticiones y promediar.
- El promedio multiplicar por la cantidad de agua (300ml) y dividir para 0.01mm (10 $\mu$ l).

# Renovación de NEPs



- Las suspensiones de NEPs sacar del refrigerador.
- Tomar 1ml de suspensión que contenga de 200 a 250 JIs
- Colocar sobre un papel filtro en una caja Petri (9cm diámetro)
- Poner 10 larvas de *G. mellonella* y tapar.



# Renovación de NEPs (continuación)



- Colocar las cajas inoculadas dentro de una funda negra de plástico.
- Incubar a 20 - 24°C por 5 días
- Pasar las larvas de *G. mellonella* a trampas White para extraer los NEPs renovados



# Multiplicación de NEPs



- Para multiplicar los NEPs en el laboratorio, seguir los mismos pasos que en la renovación.
- Incrementar el número las larvas de *G. mellonella* a ser inoculadas.
- Mantener 10 larvas por caja Petri.
- También se puede multiplicar en larvas *Spodoptera* o de *Scarabeidae*



# GRACIAS

