

Nematodos entomopatógenos en el control biológico de ácaros e insectos

Juveniles infectivos de *Steinernema riojaense* en suspensión acuosa.

Texto y fotografías: **Raquel Campos-Herrera, Rubén Blanco-Pérez, Ignacio Vicente-Díez.**

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja)

El movimiento global hacia la sostenibilidad de los recursos insta más que nunca a la adopción de herramientas alternativas de gestión de plagas de nuestros cultivos basadas en prácticas biológicamente aceptables y de bajo impacto. El uso de los nematodos entomopatógenos en la protección de cultivos, ya sea de forma directa (como agentes de control biológico) o indirecta (como bioindicadores de resiliencia de cultivos y posible asociación con otros agentes beneficiosos del suelo), es una herramienta sostenible cuya potencialidad es abordada por el nuevo grupo de investigación In-Vid del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV).

Los nematodos entomopatógenos son excelentes agentes de control biológico de plagas. Tradicionalmente, se han aplicado para el control de artrópodos (insectos y ácaros) que desarrollan su ciclo biológico total o parcialmente en el suelo, o en hábitat crípticos como grietas y galerías. Sin

embargo, el desarrollo de novedosas formulaciones para su aplicación aérea nos brinda nuevas oportunidades de uso frente a otros organismos diana. Asimismo, el estudio de su presencia natural en el suelo de los cultivos y la caracterización de las condiciones ecológicas que fomentan su

actividad nos permite expandir su uso hacia una perspectiva de control biológico por conservación. En la actualidad, el grupo In-Vid del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) conjuga técnicas tradicionales y moleculares para su estudio en campo, a la vez que persigue desarrollar técnicas de vanguardia para su aplicación aérea, principalmente contra especies de ácaros e insectos que alcanzan la consideración de “plagas” en viñedos a escala global (*Lobesia botrana* o *Tetranychus urticae*, por ejemplo). En este artículo analizaremos brevemente el contexto actual en lo concerniente al control de plagas en España y en Europa, describiremos la biología y ecología de



Emergencia de juveniles infectivos de una larva de *Galleria mellonella* previamente expuesta a una muestra de suelo de un viñedo de la DOC Rioja.

los nematodos entomopatógenos, las técnicas para su detección en los cultivos y su potencial de uso frente a plagas de insectos y ácaros.

Dentro del paradigma de “crecimiento demográfico y cambio climático”, la agricultura actual se enfrenta al desafío de producir alimentos y otros bienes (textiles, biocombustible, etc.) con garantías de calidad y respetando el medio ambiente. Este reto global de sostenibilidad de los recursos se recoge en la “Agenda 2030 para el desarrollo sostenible” promovida por la ONU, en la que la agricultura es clave para los objetivos 2 “Hambre cero” y 12 “Producción y consumo responsables”, pero que también es tomada en cuenta de forma transversal en otros cinco objetivos.

Año tras año, una gran variedad de plagas de herbívoros, patógenos y ‘malas hierbas’ son responsables directos de reducciones significativas en la calidad y cantidad de los productos agrícolas en todo el mundo. Hasta la fecha, su control se ha basado mayoritariamente en el uso (y abuso) generalizado de agroquímicos. Entre las consecuencias adversas de esta práctica no sólo se cuentan los graves problemas ambientales y de salud humana

provocados por la contaminación del aire, el suelo, el agua y los alimentos. Las altas concentraciones de agroquímicos acumulados en los agrosistemas han promovido, además, el desarrollo de resistencias en plagas y patógenos, facilitando su rápido resurgimiento, o incluso promueven que plagas secundarias se conviertan en plagas clave al afectar negativamente a sus enemigos y antagonistas naturales. Con el fin de reducir estos riesgos, la Unión Europea (UE) ha intervenido en el modo de uso de los productos fitosanitarios (a través de la Directiva 2009/128/EC), apostando por su reducción en favor de métodos “no químicos”. Esta normativa fue debidamente impleantada en España mediante el Real Decreto 1311/2012, en vigor desde el 1 de enero de 2014, y en el que se promueven acciones que garanticen, dentro del manejo integrado de cultivos (MIC), la aplicación de los principios generales de la gestión integrada de plagas (GIP). No obstante, y a pesar de la normativa vigente, el uso de plaguicidas en la UE se ha incrementado en un 4% entre los años de 2006 y 2016, y recientemente se ha constatado la presencia de residuos de plaguicidas

en más del 80% de los suelos agrícolas europeos. Además, el 50% de los cultivos europeos acumulan mezclas de varios de estos productos, cuyo efecto combinado es desconocido y, por tanto, su potencial riesgo para la salud y el medio ambiente es difícil de predecir. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad urgente de impulsar el desarrollo de herramientas eficaces y no contaminantes como son el uso y manejo de agentes de control biológico como son, entre otros muchos, los nematodos entomopatógenos.

Biología y ecología

Los nematodos son los animales más abundantes de la tierra. Su morfología es, por lo general, filiforme, y su tamaño, salvo excepciones, oscila entre 0,1 y 1,5 mm. Los nematodos son organismos acuáticos por naturaleza, pero se han adaptado a vivir también en ambientes terrestres, bien en el suelo o como parásitos dentro de otros organismos. La gran diversidad propia de estos animales se refleja en los distintos niveles tróficos que diferentes especies de nematodos pueden ocupar. De este modo podemos hablar de nematodos bacterívoros, fungívoros, omnívoros,



Figura 1. Emergencia de juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* de una larva de *Galleria mellonella*.

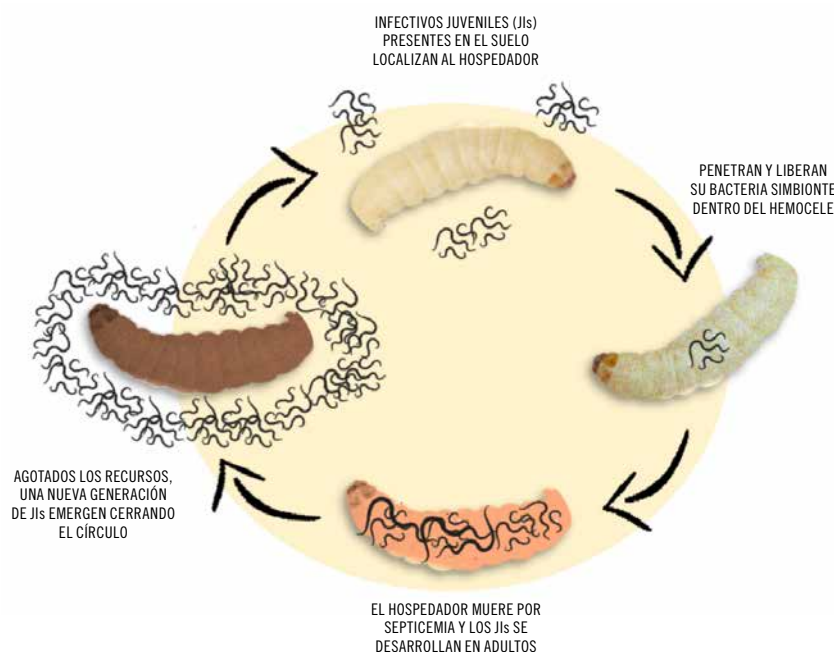


Figura 2. Ciclo biológico de los nematodos entomopatógenos.

depredadores, y parásitos de organismos de naturaleza muy distinta, como son vertebrados, artrópodos o plantas. Estos últimos, llamados nematodos fitoparásitos, son los agentes causantes de importantes daños en agricultura, tanto directos por impacto en el crecimiento y desarrollo de la planta, y consiguiente reducción de la producción, como indirectos, por ser vectores de otras enfermedades. Por ello, los nematodos son bien conocidos por los agricultores, pero con tintes muy negativos. No obstante, y aunque mu-

cho menos conocidos, existen grupos de nematodos beneficiosos para nuestros cultivos, como son los nematodos entomopatógenos (NEPs), que cumplen con un servicio ecosistémico primordial: el control biológico de plagas de artrópodos (ácaros e insectos) (figura 1).

Los NEPs se encuentran en el suelo en su estadio de resistencia denominado "juvenil infectivo" (JI), con capacidad de localizar de forma activa a su hospedador reconociendo distintas señales que delatan su presencia (vibraciones, incremento

significativo de la concentración de CO_2 , volátiles específicos producidos por las plantas dañadas por herbivoría, etc.). Tras penetrar por sus orificios naturales (boca, ano, espiráculos), alcanzan el hemocele (sistema circulatorio) y liberan la bacteria simbiote que portan en su interior. La acción conjunta de ambos organismos permite anular la respuesta inmune del hospedador y matarlo por septicemia en un plazo de 24-48 horas post-infección. Tanto la bacteria como el nematodo se reproducen dentro del cadáver durante 7-15 días, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, hasta que una nueva generación de JIs emerge de forma masiva del cadáver completando el ciclo (figura 2).

Los NEPs están presentes de forma natural en los suelos de zonas naturales y agrícolas de todos los continentes (exceptuando la Antártida). Su capacidad infectiva y de supervivencia está mediada por factores abióticos (tipo de suelo, humedad, temperatura, etc.), y bióticos (competencia inter y intraespecífica, enemigos naturales, depredadores, etc.). Muchas de las prácticas agrícolas, como, por ejemplo, el laboreo tradicional, exponen a los NEPs a condiciones extremas (de temperatura, luz ultravioleta, etc.) que reducen significativamente su capacidad de movimiento y eficacia infectiva, hasta el punto de poder llevar a poblaciones enteras a la extinción en nuestros cultivos. Con el fin de establecer las condiciones necesarias para integrar de forma eficaz el uso de estos nematodos junto a otras estrategias de control de artrópodos, resulta imprescindible conocer previamente sus poblaciones de partida y su ecología; es decir, su relación con aquellos organismos asociados a su red trófica, y cómo el conjunto de estas interacciones está modulado por las propiedades del suelo y el manejo agrícola.

Detección y fauna asociada en el suelo

El modo más simple y directo de detectar la presencia de NEPs en un cultivo es realizar inspecciones visuales en busca de artrópodos infectados, una tarea tediosa no siempre recompensada. Por ello, la técnica más habitual es el



Figura 3A. Aislamiento de nematodos entomopatógenos mediante la técnica con bioensayo de insecto-trampa.

método indirecto de “insecto-trampa”, que habitualmente se realiza mediante bioensayos en laboratorio de muestras de suelo tomadas en el campo. De forma sencilla, este método pone en contacto una muestra de suelo con larvas de insecto (habitualmente el insecto modelo *Galleria mellonella*, Lepidoptera: Pyralidae) (figura 3A). Posteriormente, se localizan las larvas que han muerto y se disponen en un sistema óptimo para el desarrollo de nematodos. Durante los siguientes 7-15 días de incubación se revisa la posible emergencia de nematodos, que serán inoculados de nuevo en larvas de *G. mellonella* para confirmar que son los agentes causantes de la infección (postulados de Koch). Una vez completado con éxito este proceso, los nematodos recogidos se establecen como poblaciones de referencia (figura 3B). En la actualidad, el grupo In-Vid dispone de una colección internacional de más de 40 aislados de NEPs, que abarcan 15 especies localizadas en varios biomas (subtropicales, continentales, mediterráneos), y que constituyen una fuente genética muy diversa para futuros estudios de mejora de poblaciones de NEPs. Hasta hoy, en La Rioja han sido aisladas con esta técnica cinco especies de NEPs: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, *S. kraussei*, *S. carpocapsae*, y la especie recientemente descubierta *S. riojaense*. De ellas, tres

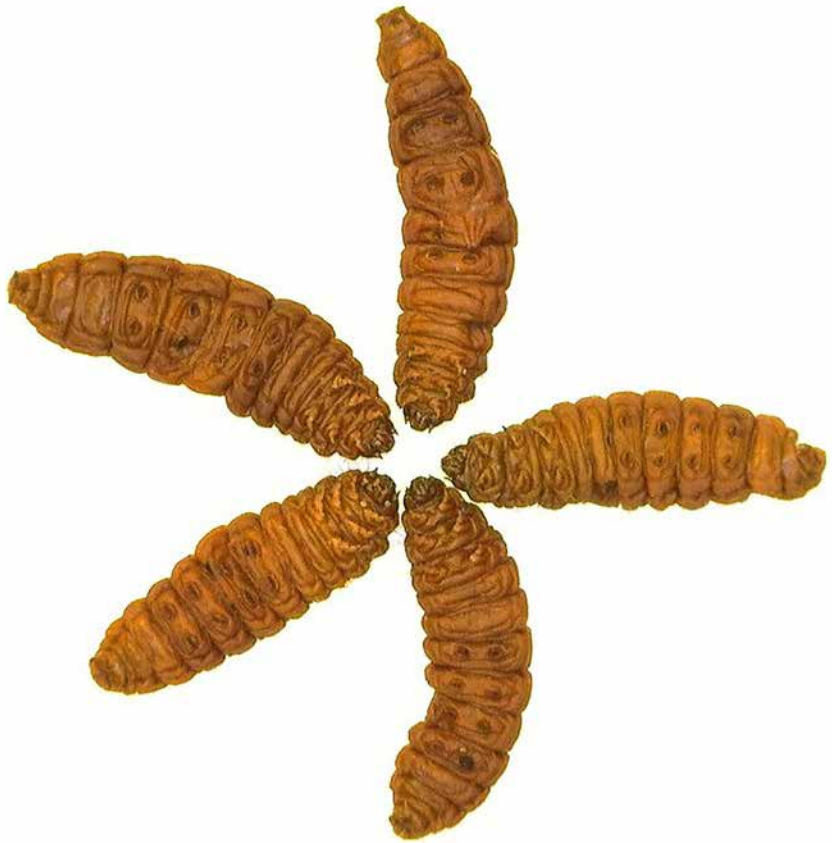


Figura 3B. Disposición en “Trampa White” donde los cadáveres del insecto modelo *Galleria mellonella* se disponen en forma de estrella para optimizar la emergencia de los nematodos entomopatógenos.

fueron recientemente aisladas en viñedos riojanos (*H. bacteriophora*, *S. feltiae* y *S. riojaense*), y son mantenidas en In-Vid para presentes y futuros estudios enfocados en combatir plagas asociadas a la vid (figura 4).

Debido a que la técnica tradicional de detección de NEPs adolece de ciertas limitaciones metodológicas, el grupo In-Vid ha desarrollado herramientas moleculares basadas en el empleo de cebadores/sondas específicos para las especies ob-

jeto de estudio, en un protocolo de amplificación de ADN en PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Esta aproximación no sólo posibilita la identificación y cuantificación de estos organismos, sino que esta herramienta es extensible a otros organismos asociados a ellos, como son hongos atrapadores, bacterias ectoparasíticas o nematodos de vida libre bacterívoros.

En la actualidad, In-Vid implementa ambas estrategias (tradicional y molecular) para obtener una visión más completa

de la presencia y actividad de los NEPs y su fauna asociada en los cultivos de La Rioja. Por ejemplo, un reciente estudio en un viñedo experimental de La Grajera (realizado en primavera y otoño de los años 2017 y 2018) evidenció que la implantación de cubierta vegetal espontánea está asociada a una mayor presencia y actividad de los NEPs en comparación a la práctica tradicional del laboreo del suelo, mientras que el uso otras cubiertas (sembrada con gramíneas o sembrada florícola) no tuvo un efecto positivo significativo (figura 5). Por otra parte, resultados preliminares de un estudio regional en curso de viñedos de la DOC Rioja (figura 6) parecen indicar que aquellos suelos de viñedos manejados en ecológico exhiben una mayor actividad contra larvas de insectos que aquellos procedentes de viñedos sujetos al manejo integrado de plagas y enfermedades. Desde la perspectiva del control biológico por conservación serán necesarios estudios que exploren los potenciales beneficios ecosistémicos del manejo en ecológico y del uso de estrategias alternativas al laboreo tradicional, así como del uso de agentes de control biológico en la lucha contra las plagas del cultivo.

Aplicación frente a plagas de artrópodos

En la actualidad, existen en el mercado varios productos comerciales basados en diferentes especies de NEPs. La mayoría consisten en formulados de JIs en substratos artificiales que incrementan el periodo de almacenamiento (que puede oscilar entre 1 y 3 meses en condiciones refrigeradas) a costa de reducir su actividad. Su aplicación se acomoda a distintas técnicas tras una simple suspensión del producto en agua. Una de las más extendidas es la de pulverización mediante tanques motorizados, recomendada para grandes superficies de frutales y otros cultivos perennes, aunque también pueden ser aplicados directamente en las líneas de riego. Recientemente, un sistema indirecto de aplicación emplea larvas de insectos previamente infectadas con NEPs, que incrementan el control en los tratamientos (por ejemplo, con aplicaciones conjuntas con el sembrado de semi-



Figura 4. Cadáveres de insectos colonizados por tres especies de nematodos entomopatógenos aislados en viñedos de La Rioja: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* y *Steinernema riojaense*.

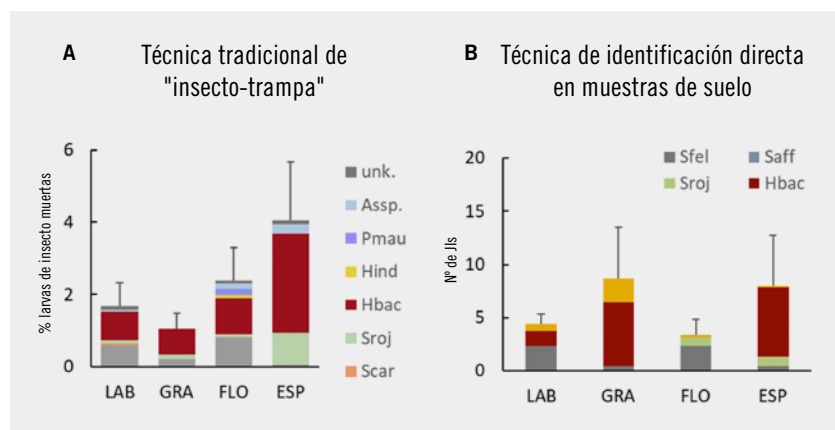


Figura 5. Resultados obtenidos a partir de dos técnicas de identificación de nematodos entomopatógenos: (A) actividad entomopatógena del suelo (postulados de Koch) definida como porcentaje de larvas de insecto positivas para emergencia de nematodos, y (B) número de juveniles infectivos (JIs) en 200 g de peso fresco de suelo cuantificados con qPCR. En colores se representa la proporción de nematodos identificados para cada uno de los tratamientos: laboreo (LAB), sembrada con gramíneas (GRA), sembrada florícola (FLO) y cubierta vegetal espontánea (ESP).



Figura 6. Toma de muestras de suelo para el estudio regional de presencia de nematodos entomopatógenos en viñedos de la DOC Rioja durante los meses de septiembre y octubre de 2019.

llas) y que, además, mantienen a los JIs protegidos de los agentes estresantes del medio, incrementando así su persistencia en el suelo. La adición a los formulados de agentes humectantes o protectores de la luz ultravioleta permite en los últimos años grandes avances hacia su aplicación aérea, aunque la mayor parte de estos productos están todavía en fases tempranas de desarrollo y aún no pueden ser implementados de forma óptima en los agrosistemas.

La agricultura es una actividad prioritaria en La Rioja. Entre la gran variedad de cultivos de esta región predominan la vid, el olivo, los árboles frutales como perales, almendros, ciruelos, manzanos y melocotoneros, y los cultivos hortícolas. Todos ellos se ven afectados en mayor o menor medida por distintas plagas de ar-

trópodos, entre los que podemos destacar a *Lobesia botrana* y *Eutetranychus carpini* en vid, *Bractocera oleae* y *Saissetia oleae* en olivo, *Ceratitis capitata* y *Capcopsylla pyri* en frutales, y *Leptinotarsa decemlineata* y *Agriotes* spp. en plantaciones de patata. Los NEPs tienen actualmente potencial para ser utilizados en el control de plagas en las que alguna de sus fases de desarrollo tenga lugar en el suelo, como es el caso de *C. capitata*, *L. decemlineata* o *Agriotes* spp. No obstante, estudios realizados con poblaciones autóctonas de La Rioja han arrojado valores muy bajos de mortalidad para dichas plagas. Por ejemplo, solo cuatro de un total de 17 poblaciones de NEPs (15 de *S. feltiae* y 2 de *S. carpocapsae*) causaron mortalidad alguna en larvas de *A. sordidus* (en ningún caso superando el 10% de mortalidad),

y tampoco fueron especialmente efectivas para pupas de *C. capitata* (ninguna superando el 50% de mortalidad). Resultados similares se observaron cuando se exploró la capacidad infectiva de una población riojana de *S. feltiae* frente a larvas de *L. decemlineata* (figura 7A). Esta limitada eficacia infectiva podría aumentar a través de un programa de mejora en el que se seleccionen aquellas poblaciones de NEPs que muestren las mejores tasas de infección. Existen además otras estrategias alternativas para elevar su potencial infectivo, como puede ser la incorporación en sus formulados de atrayentes que fueren el contacto nematodo-insecto.

Por último, In-Vid está especialmente interesado en el desarrollo de aplicaciones de los NEPs frente a plagas presentes exclusivamente en la parte aérea de la planta (hojas, tallos, etc.). Estudios recientes ya han demostrado la capacidad infectiva de algunas especies de NEPs frente a larvas y pupas de *L. botrana* (figura 7B), y de *Phyllaenus spumarius* (figura 7C), vector de la bacteria *Xylella fastidiosa*. Una vez comprobada su eficacia en condiciones de laboratorio, el siguiente paso será desarrollar formulaciones adecuadas que permitan la supervivencia de los nematodos a condiciones extremas de sequedad y luz ultravioleta. Todo apunta a que en pocos años esta tecnología estará disponible para su uso extendido frente a plagas de distinta naturaleza y sobre gran variedad de cultivos.



Figura 7. Juveniles infectivos de nematodos entomopatógenos en el interior de cadáveres de insectos. A. Pupa de *Leptinotarsa decemlineata* infectada por *Steinernema feltiae*. B. Pupa de *Lobesia botrana* infectada por *Heterorhabditis bacteriophora*. C. Ninfa de *Phyllaenus spumarius* infectada por *Steinernema carpocapsae*.