

NOTA TECNICA

Criopreservación del nemátodo *Beddingia (Deladenus) siricidicola*, controlador biológico de la avispa del pino*

Cryopreservation of the nematode *Beddingia (Deladenus) siricidicola*,
biological control agent of sirex wood wasp

MACARENA GERDING G.¹, ANDRES FRANCE I.²

¹ Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Casilla 537, Chillán. E-mail: mgerding@udec.cl

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán.

SUMMARY

The nematode *Beddingia (Deladenus) siricidicola* was introduced from Brazil, since it is the most effective biological control agent for the wood wasp, *Sirex noctilio*. In order to maintain its original characteristics through time, a protocol for the cryopreservation of this nematode was developed. The highest viability levels were obtained by incubating the nematodes, prior to immersion in liquid nitrogen, in 5% glycerol for several days until the suspension reached 60% glycerol. Viability was assessed 24 hours later by thawing the cryotubes in 37°C tap water and immersing the opened cryotube in Ringer's solution. The mean survival after storage was 73%.

Key words: Cryopreservation, *Beddingia siricidicola*, *Deladenus siricidicola*, *Sirex noctilio*, entomophilic nematode.

RESUMEN

El nemátodo *Beddingia (Deladenus) siricidicola*, el más efectivo controlador biológico de la avispa del pino *Sirex noctilio*, fue introducido al país desde Brasil. Con el fin de mantener en el tiempo las características originales del nemátodo, se desarrolló un protocolo de criopreservación. Los mayores niveles de supervivencia fueron logrados al incubar los nemátodos en glicerol al 5% que fue concentrado hasta alcanzar el 60%, antes de almacenarlos en nitrógeno líquido. La viabilidad se evaluó 24 horas después, descongelando los criotubos por inmersión en agua a 37°C y luego depositando el criotubo abierto en solución Ringer. La supervivencia promedio después de almacenaje fue de 73%.

Palabras clave: Criopreservación, *Beddingia siricidicola*, *Deladenus siricidicola*, *Sirex noctilio*, nemátodo entomofílico.

INTRODUCCION

La avispa del pino, *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae), es una plaga de importancia económica para varias especies de *Pinus*. En su estado adulto ovipone en el tronco de pinos vivos, donde sus larvas se alimentan de un hongo

simbionte que crece dentro de la madera, dejando múltiples perforaciones, debilitando el árbol y destruyendo su valor comercial. La hembra de *S. noctilio*, junto con oviponer, deposita blastosporas del hongo *Amylostereum areolatum* (Fr.) Boidin y un mucus tóxico que causa marchitez del follaje y debilita la zona de oviposición, facilitan-

* Financiado por Controladora de Plagas Forestales S.A.

do la colonización del hongo. La interacción entre el hongo y el mucus tóxico deshidrata la madera, creando un ambiente favorable para el desarrollo de las larvas, las que perforan la madera en busca del micelio del hongo (1, 2).

Debido a los daños que produce esta plaga, se le considera primaria y cuarentenaria, obligando a los países que la poseen a realizar tratamientos de erradicación, tales como la fumigación con bromuro de metilo en las maderas de exportación, junto con realizar controles en los bosques.

El control biológico ha jugado un papel fundamental contra la avispa del pino. Dentro de los controladores destacan diversas especies de avispas parasitoides y el nemátodo *Beddingia (Dela-denus) siricidicola* Bedding (Nematoda: Neotylenchidae), siendo este último el agente de control más eficiente, logrando mantener un alto nivel de parasitismo de la plaga y, en consecuencia, un bajo daño económico (3, 4).

Beddingia siricidicola puede alcanzar niveles de parasitismo cercanos al 100%, dependiendo de la densidad del hospedero. El ciclo biológico de *B. siricidicola* está compuesto de dos fases: una de vida libre o micetófaga y otra parasítica. En la primera, el nemátodo se mueve libremente a lo largo de los vasos del árbol, alimentándose del hongo *A. areolatum*. En este proceso puede entrar en contacto con una larva de *Sirex*, transformándose al estado infectivo o parasítico que se introduce en la larva. Dentro de la larva de la avispa, las hembras de *Beddingia* alcanzan grandes proporciones (1.000 veces el volumen original) y producen miles de nemátodos que se alojan en el sistema reproductivo del *Sirex*, dejándolo infértil. Al emerger los adultos de *Sirex*, los nemátodos son transportados por la avispa a otros árboles, donde ellos comienzan un nuevo ciclo de vida libre (5).

Beddingia siricidicola es originario de Europa y norte de África, desde donde se ha movilizado, junto con su huésped o en forma artificial, como agente de control biológico (6). En Australia y Brasil se han logrado buenos niveles de control de *S. noctilio* con la introducción de este nemátodo parásito; sin embargo, uno de los principales problemas observados ha sido la pérdida de la habilidad parasítica del nemátodo, debido al continuo cultivo de *B. siricidicola* en medios artificiales (6-8). Para mantener la habilidad parasítica

original del nemátodo y evitar los continuos tras-pasos en medios artificiales, se desarrolló durante los años 80, en Australia, un método de criopreservación, el cual no se publicó por razones de patente (Dr. R. Bedding, comunicación personal).

Sirex noctilio se ha desplazado por el mundo en forma accidental, como larvas en embalajes de madera, o por sus propios medios, ya que tiene una alta capacidad de vuelo (20 a 30 km por año). En efecto, esta plaga se desplazó desde su lugar de origen, Europa Central, hasta Nueva Zelandia, Australia y Sudáfrica (7). En 1980 se reportó por primera vez en Sudamérica, encontrándose los primeros focos en Uruguay. Se asume que tales focos fueron los que posteriormente se desplazaron a Brasil y Argentina (4). En enero del 2001 el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) detectó un foco de la plaga en las cercanías de la ciudad de Los Andes, V Región de Chile (9, 10), lo que significó la implementación de un programa especial por parte del SAG, que incluyó la erradicación del hospedero en un área de 50 km alrededor del foco detectado, junto con un aumento del monitoreo más allá del área de vuelo de la avispa. En la actualidad existen más de 20 focos en la IX y X Regiones del país y varias zonas cuarentenadas.

De diseminarse esta avispa en las principales zonas de plantación de pinos, las consecuencias podrían ser relevantes para la industria forestal. Por consiguiente, es importante prevenir la diseminación de la plaga y contar con el principal controlador biológico en nuestro país, en una población tal, que pueda ser liberado en corto tiempo y controlar la avispa desde el momento en que sea declarada plaga endémica. Esto puede ser realizado mediante la criopreservación de nemátodos, lo que permite mantener una alta población en un espacio reducido y conservando las características originales del individuo. Los métodos de criopreservación no son estándar y cada organismo requiere un protocolo propio, especialmente en el caso de *Beddingia* que vive en galerías en el tronco del pino, soportando una alta presión osmótica. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de criopreservación propio para *Beddingia siricidicola*, que permitiera mantener este nemátodo y recuperarlo en altas proporciones luego de ser descongelado del nitrógeno líquido.

MATERIAL Y METODOS

Los ensayos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro Regional de Investigación Quilamapu-INIA. Se utilizaron poblaciones de *B. siricidicola* raza Encrusilhada, suministradas por el Programa Nacional de Controle à Vespa-da Madeira, del Centro Nacional de Pesquisa de Florestas de EMBRAPA, Brasil y cuarentenadas por el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile. Los nemátodos fueron reproducidos en granos de trigo previamente inoculados con *Amylostereum areolatum*, posteriormente extraídos desde los granos con agua destilada estéril, contabilizados y suspendidos posteriormente en los diferentes tratamientos de osmoacondicionantes.

Los tratamientos de osmoacondicionantes evaluados fueron los siguientes:

- Incubación a concentraciones fijas de 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 33% de glicerol, mantenidas a 20°C por 24, 36, 48, 60 y 72 h, con y sin sucrosa 0,4 M. (11). Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial de 7 concentraciones de glicerol por 5 tiempos y por 2 concentraciones de sucrosa.
- Incubación a concentraciones de 15, 18, 21, 24 y 27% de etilenglicol, a 20°C por 24, 28 y 36 h, con y sin sucrosa 0,4 M. Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial de 5 x 3 x 2.
- Incubación a concentraciones de 15, 18, 21, 24 y 27% de dimetilsulfóxido por 24, 28 y 36 h, con y sin sucrosa 0,4 M (12). El arreglo factorial de los tratamientos fue de 5 x 3 x 2.
- Incubación en glicerol al 15, 18, 21 y 24% por 24 y 48 horas, y preenfriamiento controlado (1°C/min) (13). Se evaluaron reducciones de temperaturas cada 10°C, desde +20°C hasta -40°C.
- Incubación en glicerol al 5%, concentrado paulatinamente en una cámara de flujo laminar (6), hasta alcanzar concentraciones de 50, 60, 70 y 80% glicerol.

Todos los experimentos anteriores tuvieron un arreglo factorial de los tratamientos con cuatro repeticiones y un diseño estadístico completamente al azar.

Una vez completadas las incubaciones anteriores, éstas fueron sumergidas en el nitrógeno líquido, mantenidas por 48 horas y luego descongeladas para evaluar la supervivencia de los ne-

mátodos a cada tratamiento. Los tratamientos de descongelado fueron los siguientes:

- descongelado del tubo por inmersión en agua a 37°C.
- descongelado directo de los nemátodos en solución Ringer (SR) (14) a 23°C.
- descongelado del tubo a 37°C por 5, 10, 15, 20 segundos y posteriormente traspaso a SR.

Luego del descongelado, los nemátodos fueron mantenidos en una cámara a 23°C. Las evaluaciones de supervivencia se efectuaron 24 horas después del descongelado, aceptando como sobrevivientes a aquellos nemátodos que recuperaron su movilidad completa.

Los datos fueron graficados y analizados a través del programa estadístico Microcal Origin versión 3.54 (Microcal software Inc., Ma USA).

RESULTADOS Y DISCUSION

En los tratamientos de osmoacondicionamiento en glicerol a concentraciones fijas, incubación en glicerol más sucrosa, uso de etilenglicol y dimetilsulfóxido como crioprotectores e incubación en glicerol más preenfriamiento, no se observó supervivencia de nemátodos después de criopreservados con ninguno de los tratamientos de descongelación. El único tratamiento que arrojó resultados positivos fue el uso de glicerol al 5% que fue paulatinamente concentrado. Dentro de los tratamientos de concentración de glicerol a partir de 5%, los mayores niveles de supervivencia se obtuvieron al llegar a una concentración de 60% glicerol ($P < 0,05$) (figura 1).

En el descongelado de los nemátodos luego de la criopreservación, los mayores niveles de nemátodos vivos se obtuvieron con el tratamiento en agua a 37°C seguido de solución Ringer a 23°C por 24 h ($P < 0,05$) (figura 2). Es importante destacar que el momento de descongelación corresponde a un punto crítico dentro de la criopreservación de *B. siricidicola*, ya que los mejores resultados se obtuvieron depositando el tubo por sólo 10 s en agua a 37°C, y pequeñas variaciones de tiempo disminuyen considerablemente la supervivencia (figura 2). Además, el descongelado debe realizarse inmediatamente después de retirados los tubos del nitrógeno líquido, ya que una demora induciría la formación de cristales de hielo causando el rompimiento de paredes celulares.

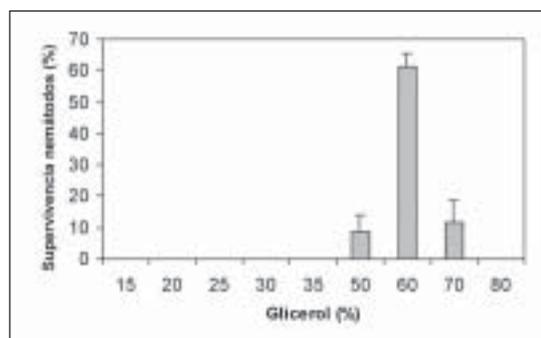


Figura 1. Porcentaje de nemátodos vivos luego de la criopreservación, sometidos a acondicionamiento con distintos niveles de glicerol. Las barras verticales en cada columna corresponden al error estándar de las medias.

Viability of nematodes after cryopreservation, conditioned at different glycerol levels. Vertical bars represent standard error of means.

Según lo observado en los ensayos, los nemátodos juveniles son los que presentaron mayores niveles de supervivencia en nitrógeno líquido, por lo que es conveniente utilizar colonias frescas para el proceso de criopreservación para asegurar una gran cantidad de juveniles que sobrevivan a este proceso.

Existe una alta probabilidad de que *S. noctilio* continúe diseminándose en Chile, debido a la ausencia de enemigos naturales, períodos de sequía prolongados durante el verano que provocan estrés en los árboles haciéndolos más atractivos a la colonización de la avispa, y a la falta de intervenciones silvoculturales, lo que propicia condiciones ambientales favorables para la colonización, establecimiento y dispersión de ésta (1).

A nivel internacional existe una vasta experiencia en el control de *Sirex*; en Australia y Nueva Zelanda, desde 1979 hasta 1987, se ha observado hasta un 80% de árboles muertos por *S. noctilio* en 50.000 ha (7). Como resultado de la introducción del nemátodo *B. siricidicola* en 1987 y la selección de cepas con mayor habilidad parasítica, en los siguientes dos años la población de la avispa disminuyó considerablemente, llegando, en algunos casos, a niveles de control cercanos al 100% (6). Las ventajas que presenta *B. siricidicola*, por sobre otros parasitoides son presentar un ciclo de vida libre que puede ser criado y multi-

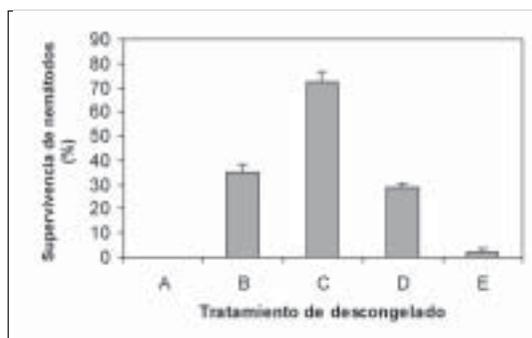


Figura 2. Porcentaje de nemátodos vivos luego de la criopreservación, sometidos a distintos tratamientos de descongelado (A: agua a 37°C por 10 seg; B: agua a 37°C por 5 seg + inmersión en SR; C: agua a 37°C por 10 seg + inmersión en SR; D: agua a 37°C por 15 seg + inmersión en SR; E: inmersión en SR). Las barras verticales en cada columna corresponden al error estándar de las medias.

Viability of nematodes after cryopreservation, with different thawing treatments. (A: 10s in 37°C water; B: 5s. in 37°C water + immersion in Ringer's solution C: 10s. in 37°C water + immersion in Ringer's solution; D: 15s. in 37°C water + immersion in Ringer's solution; E: immersion in Ringer's solution). Vertical bars represent standard error of means.

plicado en laboratorio, en medios de cultivo inoculados previamente con el hongo *A. aeriolatum*. El método de producción de nemátodos es sencillo, rápido, eficiente, de bajo costo y fácil de inocular en campo (4, 15)

El continuo subcultivo de *B. siricidicola* en medios artificiales sin el paso por su fase parasítica, ha llevado al desarrollo de razas que raramente producen hembras infectivas, incluso a bajas concentraciones CO₂ y bajo pH, condiciones que inducen la formación de este estado (6). El desarrollo del sistema de conservación en nitrógeno líquido descrito permitirá mantener la integridad genética del nemátodo indefinidamente, sin tener que volver a aislar el nemátodo desde su forma parasítica (6). Además, altas poblaciones de *B. siricidicola* serán mantenidas en un espacio reducido y estarán rápidamente disponibles al momento de hacerse necesario el control de *S. noctilio* en Chile, lo que permitirá que los nemátodos tengan tiempo suficiente para distribuirse e incrementar en número en terreno, controlando la plaga en forma más rápida y efectiva.

CONCLUSIONES

El alto porcentaje de supervivencia de nemátodos alcanzado con el método anteriormente descrito permite contar con un efectivo y práctico sistema de criopreservación para *Beddingia siricidicola*, permitiendo mantener sus características originales a través del tiempo y sin la necesidad de continuos repiques.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TADEU E., S. CHIARELLO, M.S. PEREIRA. Utilização do nematoide *Deladenus siricidicola* (Nematoda: Neotylenchidae) no controle biológico de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), praga de *Pinus* spp. In: International Union of Forest Research Organisations. 1998 (Citado: 27 Febrero 2001). Disponible en: <http://www.ersac.umn.edu/iufro/iufronet/d6/wu60304/ponencias/tema1/tadeue.html>
- (2) WATLER, D. AND S. LAKE. *Sirex noctilio*, Sirex wasp. In: Plant Health Risk Assessment Unit. Canadian Food Inspection Agency. 1996 (Citado: 27 Febrero 2001) Disponible en: <http://www.cfia-hacia.agr.ca/english/ppc/science/pps/datasheet/sirnoce.html>
- (3) BEDDING, R. A., R.J. AKHURST. Geographical distribution and host preferences of *Deladenus* species (Nematoda: Neotylenchidae) parasitic in siricid woodwasps and associated hymenopterous parasitoids. *Nematologica*, 1978, N° 24, p. 286-294.
- (4) QUINTANA, S.L., S. MURUAGA, H.A. VILTE, C.B. GALLARDO. Avispa barrenadora de los pinos, *Sirex noctilio* F., plaga forestal clave de importancia económica y cuarentenaria. *SAGPyA-Forestal*, 1999, N° 1, p. 6-15.
- (5) BEDDING, R.A. Biology of *Deladenus siricidicola* (Neotylenchidae) an entomophagous mycetophagous nematode parasitic in siricid woodwasps. *Nematologica*, 1972, N° 18, p. 482-493.
- (6) BEDDING, R.A. Biological control of *Sirex noctilio* using the nematode *Deladenus siricidicola*. In: Bedding R.; Akhurst, R. and Kaya, H. *Nematodes and the biological control of insect pests*. CSIRO, Australia, 1993, p. 11-20.
- (7) NEUMANN, F., J. MOREY, R. MCKIMM. The sirex wasp in Victoria. Department of Conservation, Forest and Lands, Melbourne, Australia. *Bulletin*, 1987 N° 29, 41 p.
- (8) REBUFFO, S. *La Avispa de la madera Sirex noctilio F. en el Uruguay*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay, 1990. 17 p.
- (9) SAG. Detección de la avispa taladradora de la madera, *Sirex noctilio*, en Los Andes, V Región. In: Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Departamento de Protección Agrícola y de Comunicaciones. 2001 (Citado: 10 Febrero 2001). Disponible en: <http://www.sag.gob.cl/saginter/html/sirexnoc.html>
- (10) SAG. Desarrollo de planes de emergencia o contingencia para el control y erradicación de plagas cuarentenarias. In: IV Patrimonio Fitosanitario Nacional. Cuenta Pública 2001 (Citado: 6 Agosto, 2003). Disponible en: http://www.sag.gob.cl/contendortmp/Cuenta_Publica_de_Gestion_2001/IV_Patrimonio%20Fitosanitario.pdf
- (11) CURRAN, J., C. GILBERT, K. BUTLER. Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. *Journal of Nematology*, 1992, vol.24, N° 2, p.1-2.
- (12) ZUCKERMAN, B.M., M.B. DICKLOW, G.C. COLES, H.B. JANSSON. Cryopreservation studies on the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. *Revue Nematol.*, 1988, vol. 11, N° 3, p. 327-331.
- (13) KAYA, H., P. STOCK. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. *Manual of Techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego, California, USA. 1997: 281-324 p.
- (14) BECNEL, J. Complementary techniques: Preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: LACEY, L. *Manual of Techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego, California, USA. 1997: 338-353 p.
- (15) CHIARELLO, S., E. TADEU, C. CASTELLANO. Aspectos biológicos e recomendações para criação massal e uso do nematoide *Deladenus siricidicola* (Nematoda: Neotylenchidae) no controle biológico de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa. In: Taller de Crianza y Criopreservación de *Deladenus siricidicola*, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, 1999. 25 p.

Recibido: 16.09.03
Aceptado: 02.08.04