

Actividad de *Raoultella sp.* como entomopatógena de *Tecia solanivora* frente a: AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas



**Diana Katherine Moreno Quintana
María Camila Obando León**

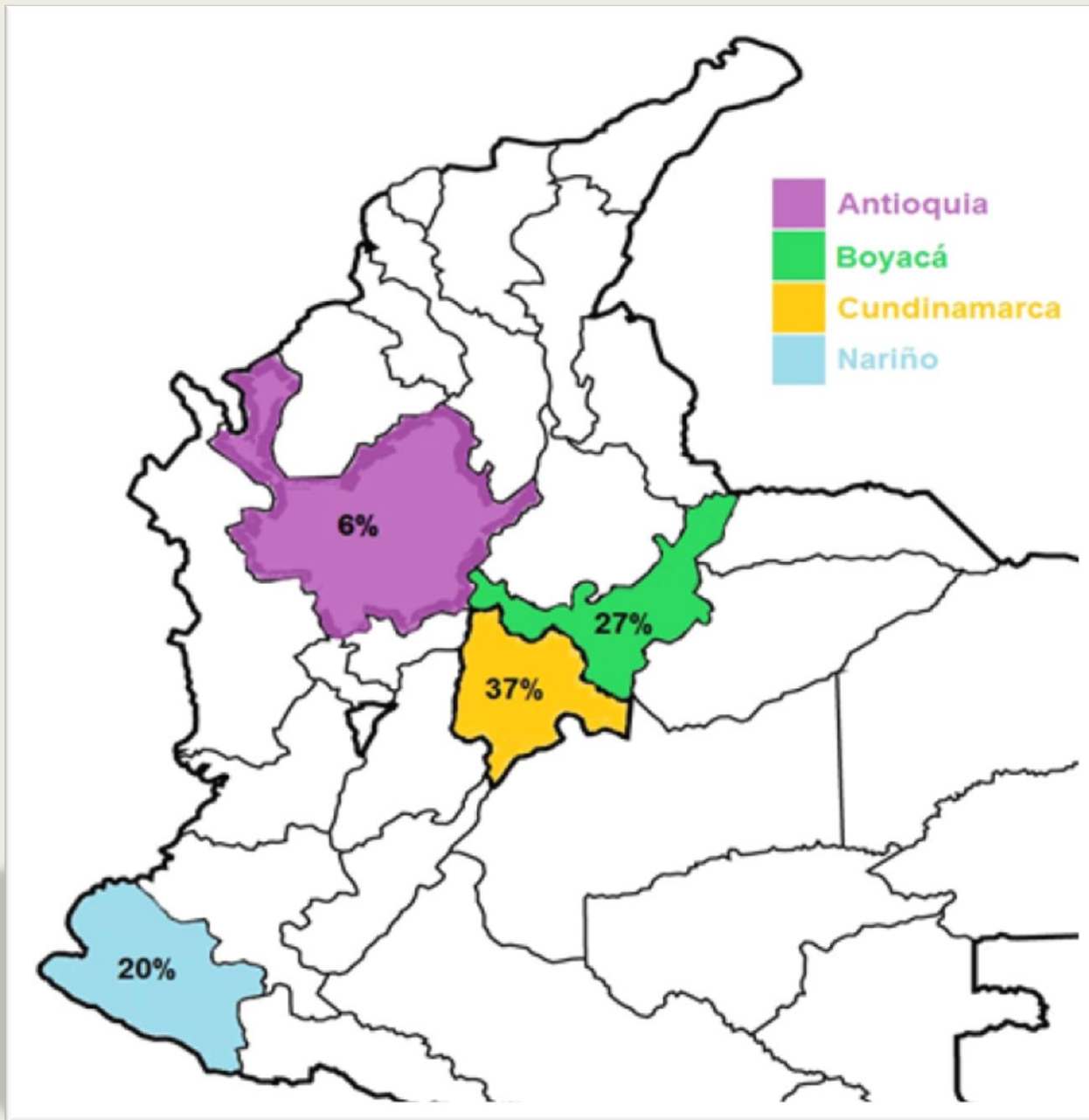


**Asesor interno
Carolina Jaime Rodríguez**


Especialista y Magíster en Gestión Ambiental - Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**Asesor externo
Dr. Javier Vanegas Guerrero - Universidad Antonio Nariño**

Bogotá D.C, 2018



PRINCIPALES DEPARTAMENTOS PRODUCTORES DE PAPA EN COLOMBIA



La papa en Colombia genera anualmente cerca de 264 mil empleos.

En Colombia se cultivan 60 variedades de papa en 130.000 hectareas

Su producción es de 2.751.837 toneladas.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural (2018)

Tecia solanivora

The background of the slide features a close-up of several potato tubers. Some tubers show significant damage, with brown, necrotic areas where the flesh has been eaten. A moth, identified as Tecia solanivora, is shown in two positions: one is in flight on the left side, and another is perched on a tuber on the right side. The overall scene illustrates the pest's impact on potato crops.

Ocasiona
perdidas
económicas
entre el 30 -50%
de los costos de
producción.

Parte del ciclo de
vida de la polilla se
desarrolla bajo el
suelo, lo que dificulta
su control.

Boletín de la papa. Corpoica (2000)

Control químico contra *T. solanivora*

- Resistencia de la plaga a los insecticidas
- Destrucción de los enemigos naturales
- Presencia de residuos químicos en los tubérculos.
- Contaminación de los suministros de aguas y daños irreversibles en los suelos.



Existe un alarmante nivel de intoxicación por plaguicidas en las comunidades campesinas

The word "ANTECEDENTES" is centered on the page. It is framed by two large, thick, black L-shaped brackets. One bracket is in the top-left corner, and the other is in the bottom-right corner. The word itself is in a bold, black, serif font.

ANTECEDENTES

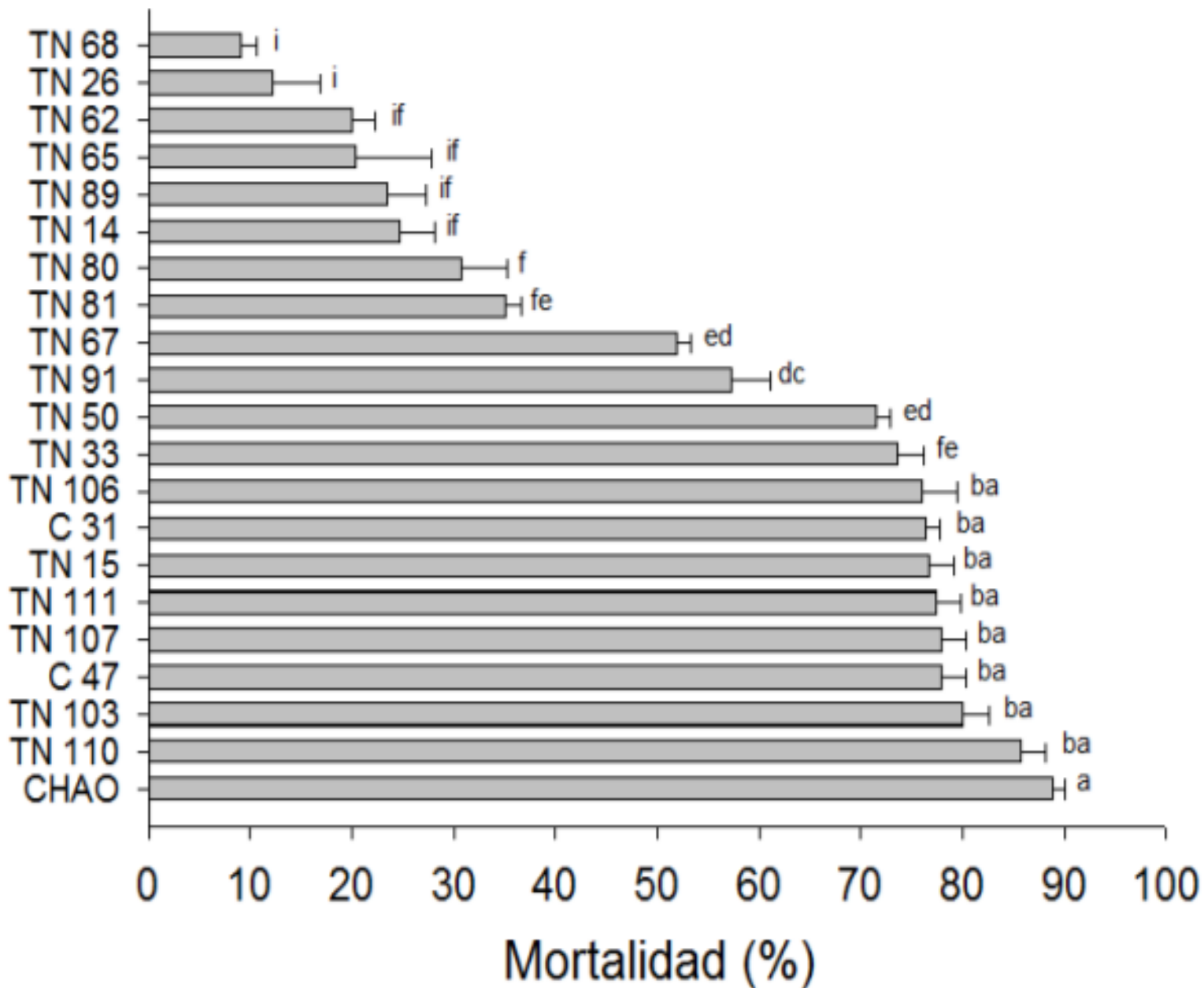
Biocontrol de *T. solanivora*

Cortes, A. (2004) actividad biocontroladora de *Serratia marcescens* contra *T. solanivora* (59-65%).

Suquillo et al, (2012) *Baculovirus* y *Bacillus thuringiensis* contra *T. solanivora* (98%).

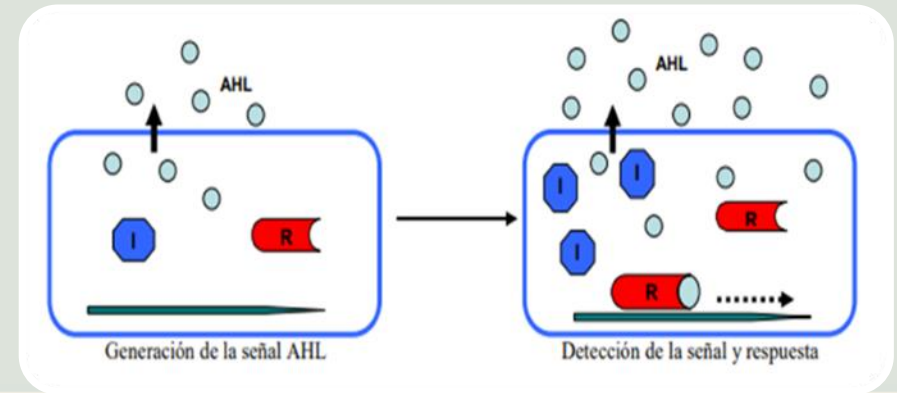
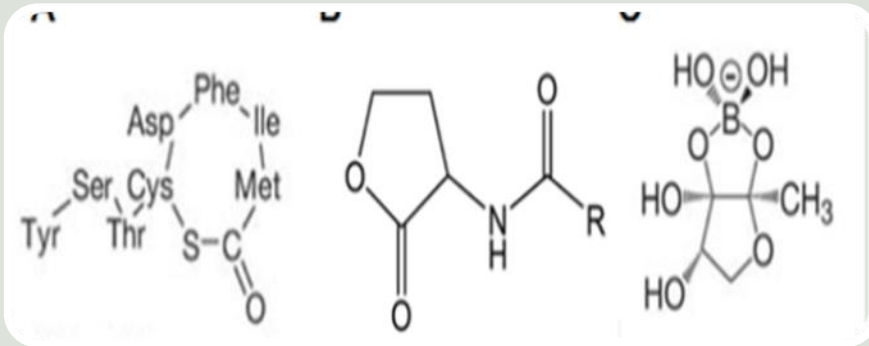
Baculovirus presenta una eficacia del 80% contra *T. solanivora*, en cultivos de papa, especialmente, en papas almacenadas. Quiroga, et al, (2014).

Son limitados los reportes del control de *T. solanivora* con el uso de rizobacterias.



Raoultella sp. como mejor opción

- Tiene actividad entomopatógena y producción de AHLs.
- Al ser rizobacteria garantiza la colonización de la planta actuando en el área deseada.



Quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación basado por moléculas señal como Acil homoserina lactona, influenciado por la densidad de la población.

Las AHLs :
 Bio-películas, expresión de factores de virulencia, producción de metabolitos secundarios y mecanismos de resistencia al estrés

Anandhakumar y Zeller (2008) *Raoultella* sp inhibe a *Phytophthora* spp.

Kotan et. al, (2009) *Raoultella* sp. Inhibe a *Aspergillus flavus*.

Li et. al, (2014) *Raoultella terrigena* protege plantas de tomate contra nematodos.

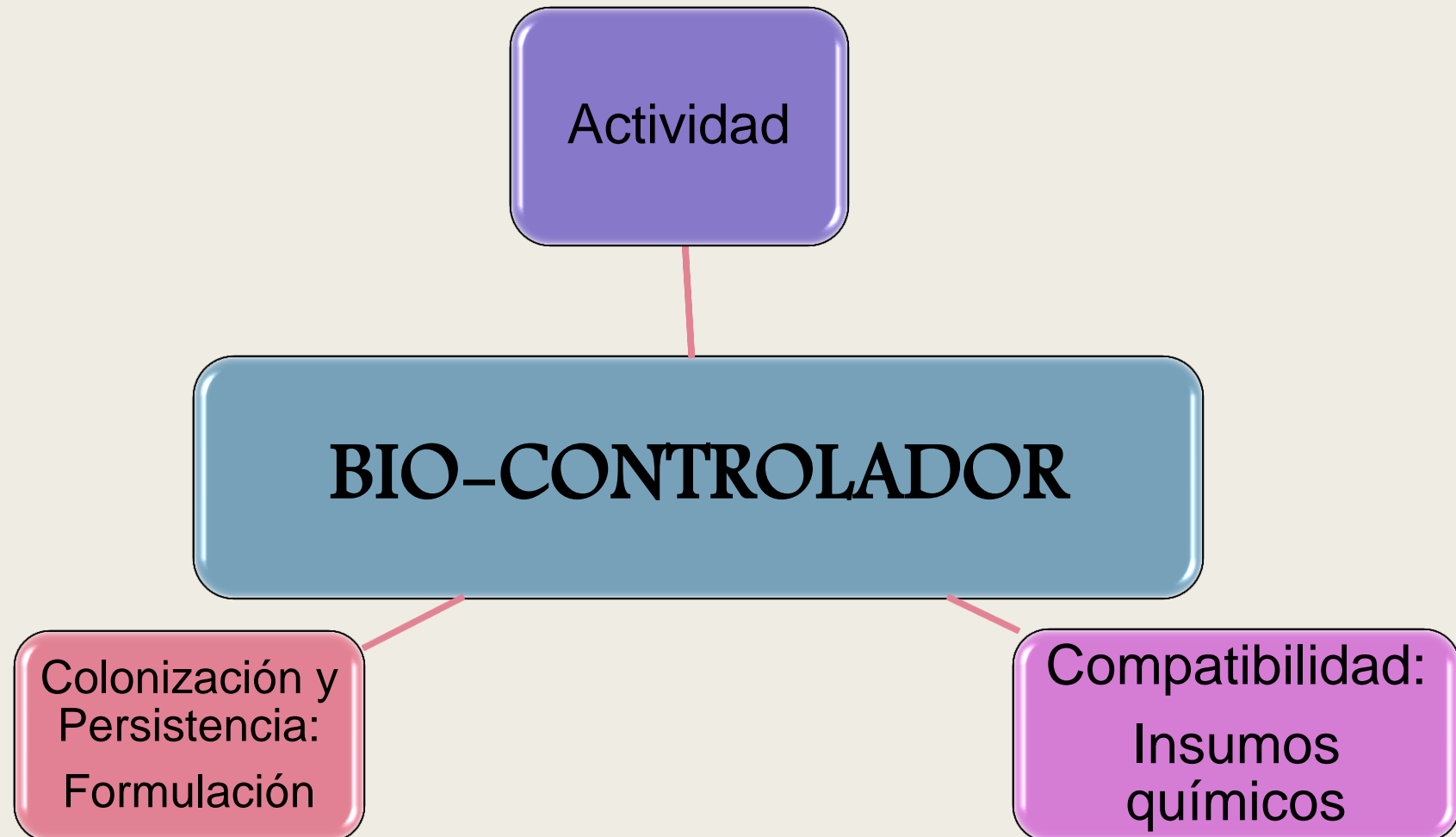
Actividad biológica de *Raoultella* sp.

Formulación de bacterias entomopatógenas

Rosas N. (2002) selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica contra *Diatraea sp*, aumento la viabilidad mediante polímeros bio-degradables como el almidón de maíz y la gelatina.

Rosas N. (2008), el desarrollo de las formulaciones insecticidas elaboradas a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* determina el éxito del inoculante.

Condiciones para un buen bio-controlador



OBJETIVOS

Objetivo general:

Potenciar la actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* mediante el uso de AHLs (N-Acil homoserin lactona), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas.

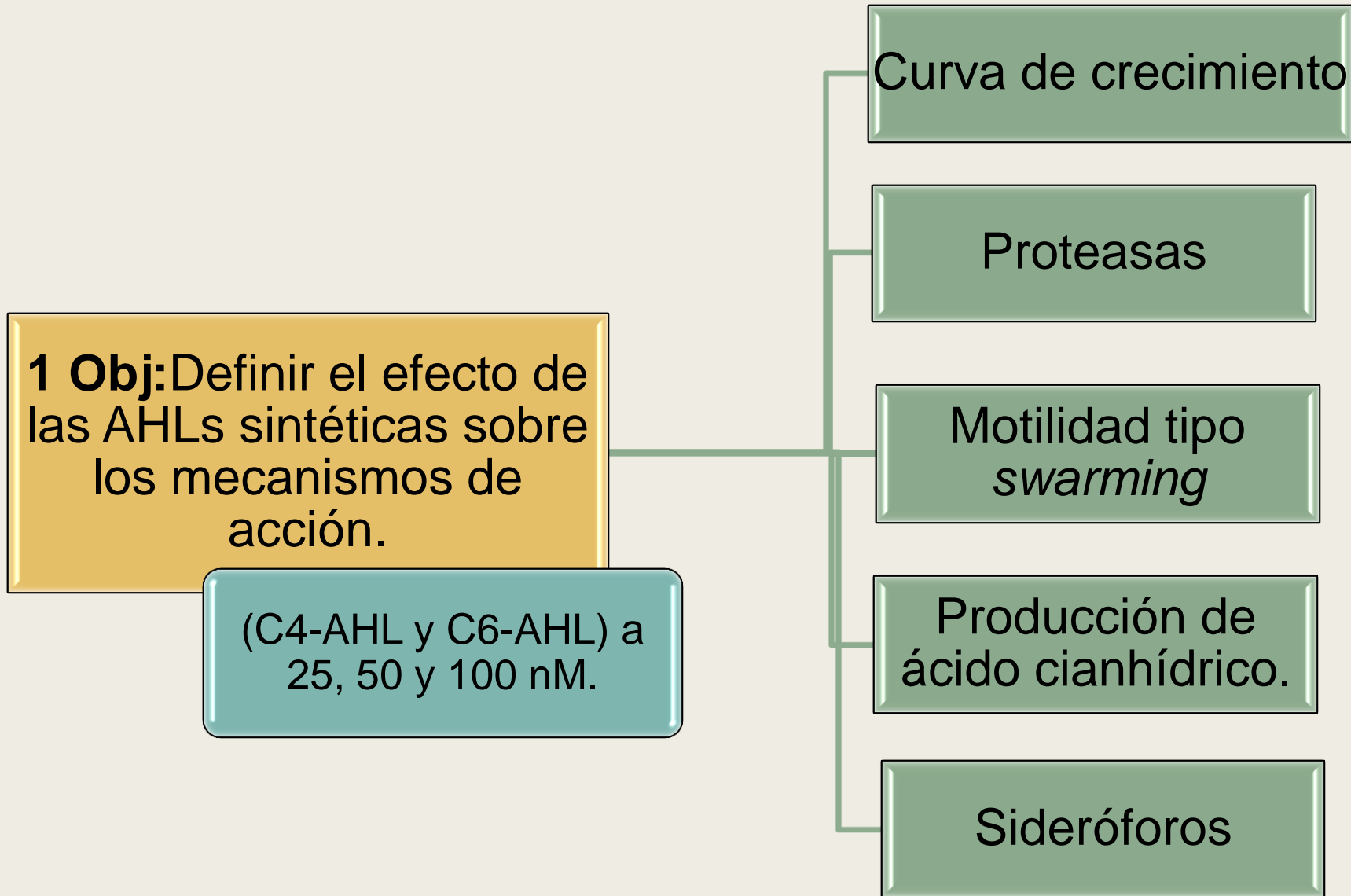
Objetivos específicos:

1. Definir el efecto de las AHLs sintéticas sobre los mecanismos de acción
2. Determinar la viabilidad de *Raoultella*.
3. Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella* sp. y una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal.
4. Determinar la compatibilidad de *Raoultella* sp. con los insumos químicos.

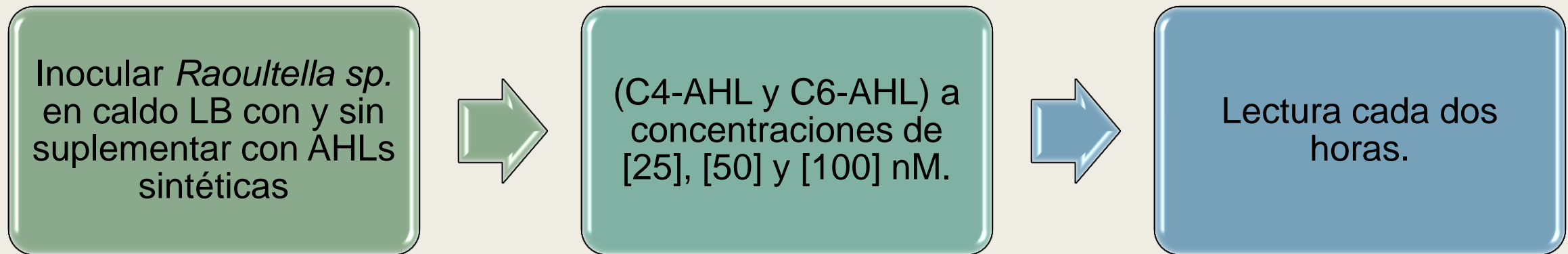


METODOLOGÍA



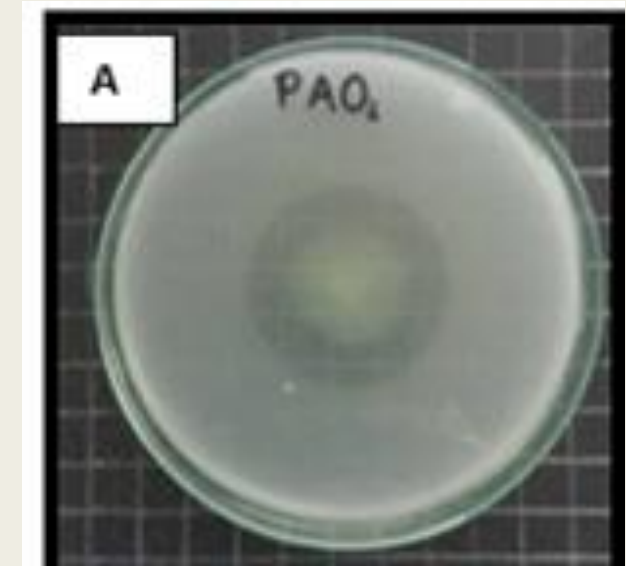
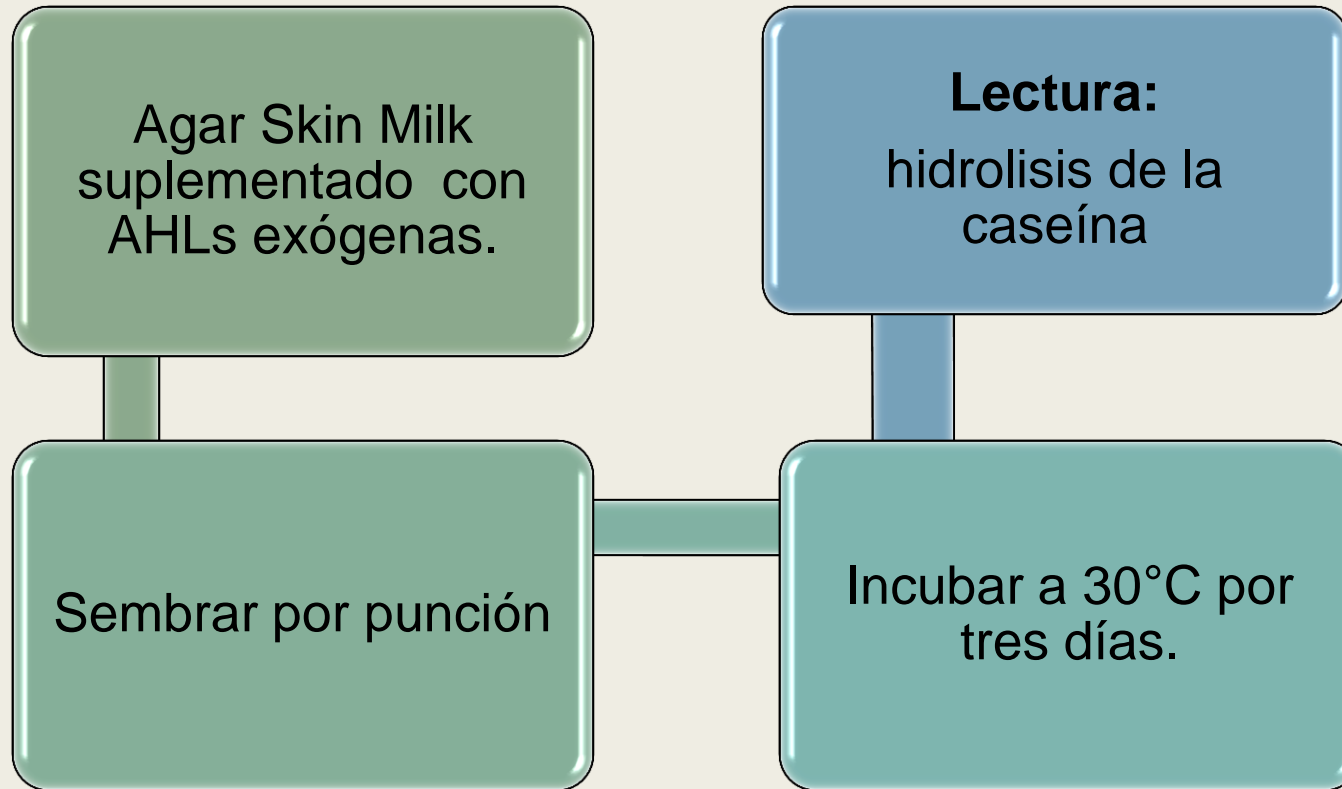


Efecto de AHLs sobre el crecimiento de *Raoultella sp.*



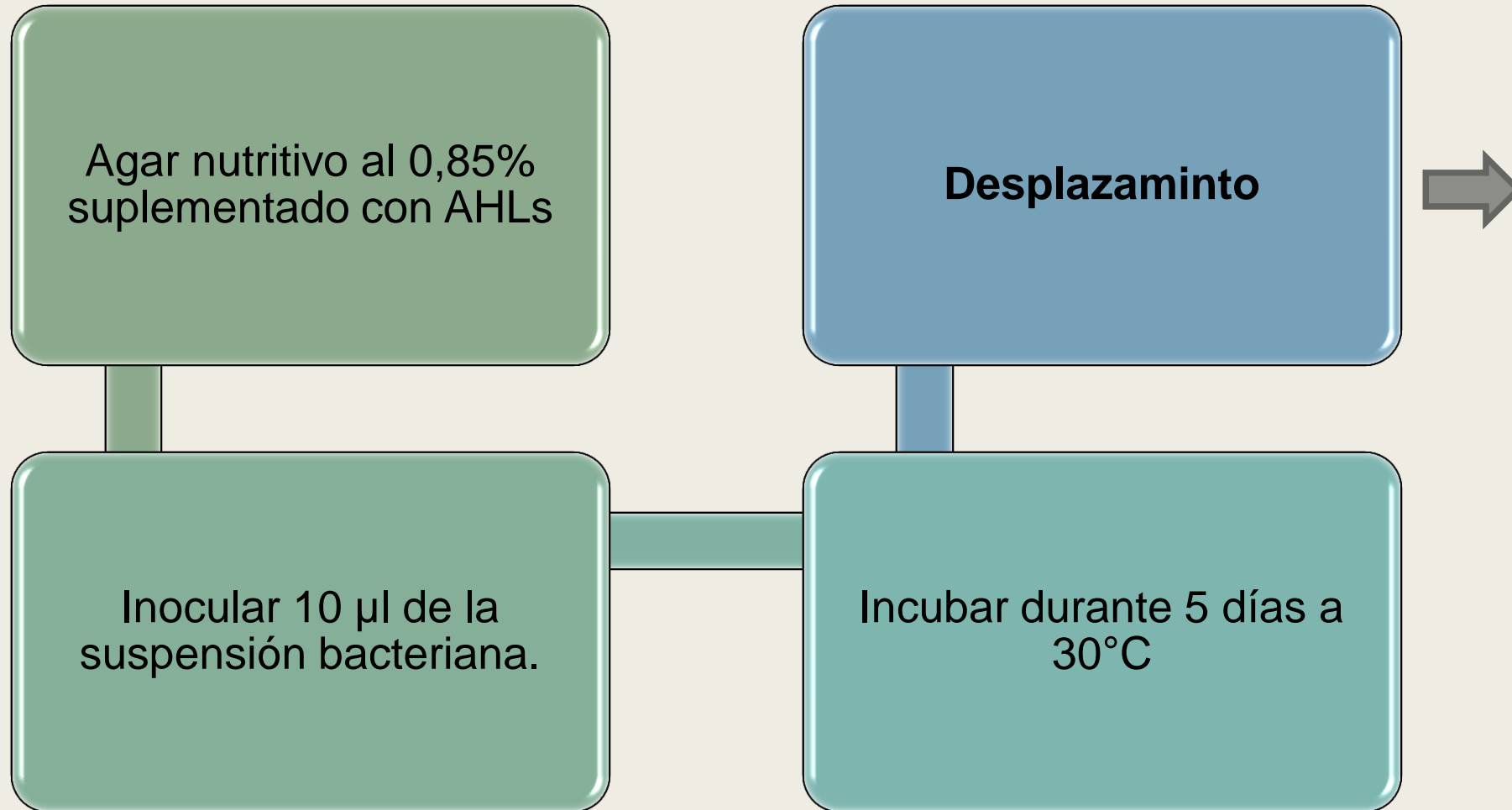
Mantilla (2006)

Proteasas

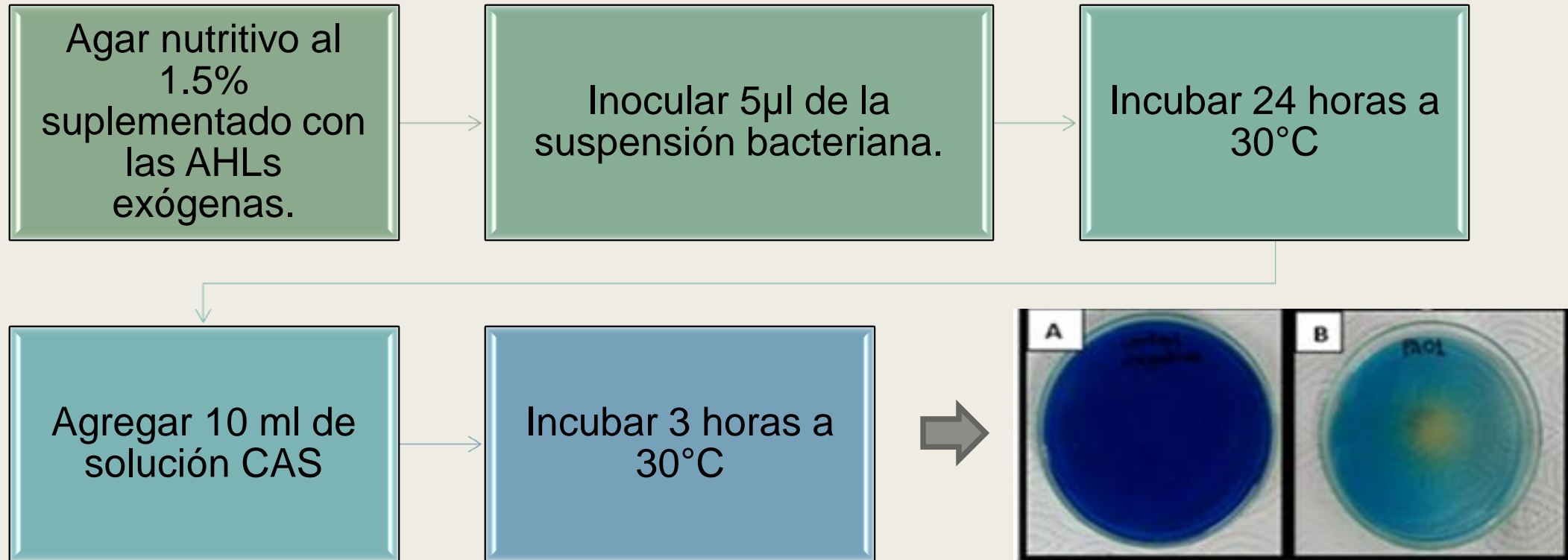


Suárez y Herrera (2012)

Motilidad tipo *swarming*

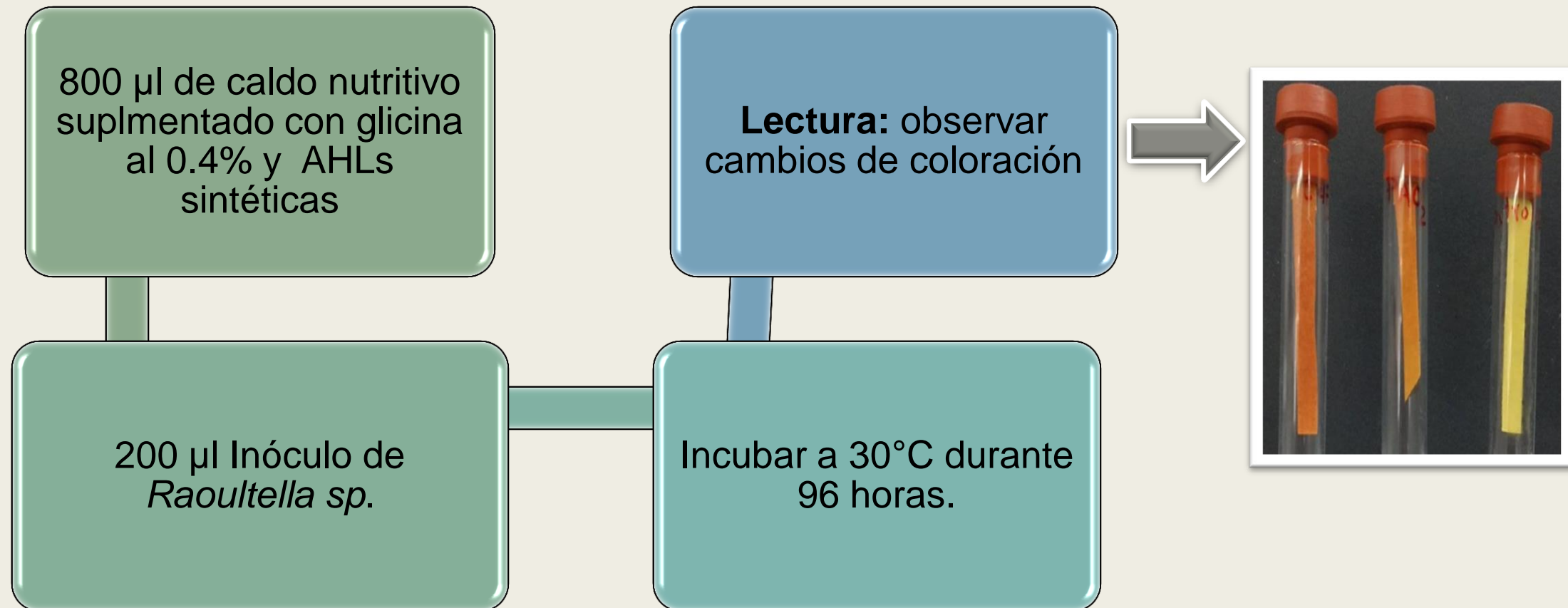


Sideróforos



Dertz (2004)

Producción de Ácido Cianhídrico



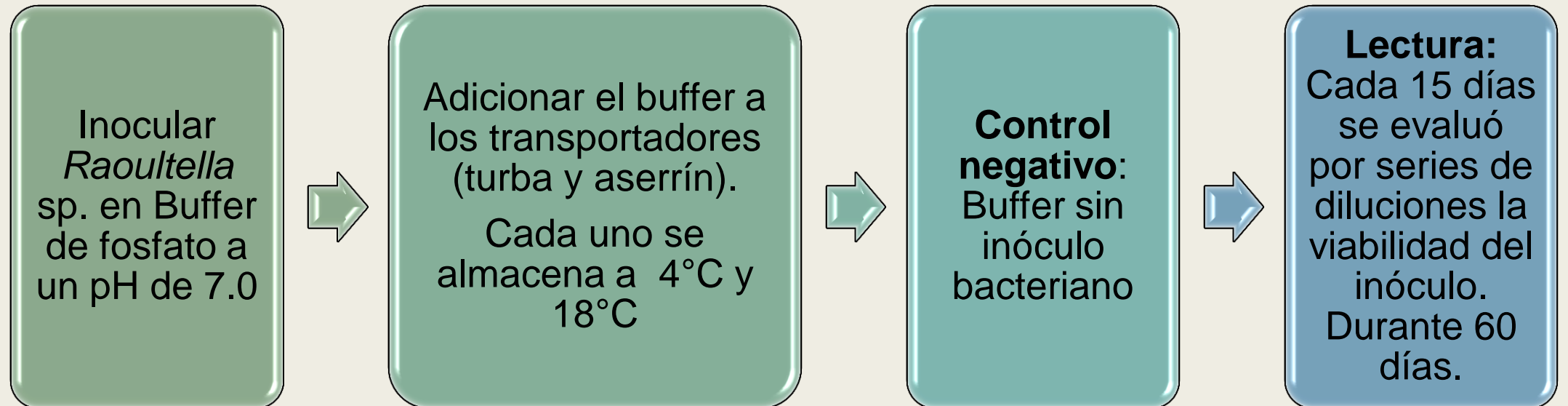
2 Obj: Determinar la viabilidad de *Raoultella* sp. en tres transportadores (Turba, aserrín y líquido).

Capacidad de retención de agua y pH del transportador

Método para el recuento de colonias en placa

Preparación de la formulación

Preparación de la formulación.

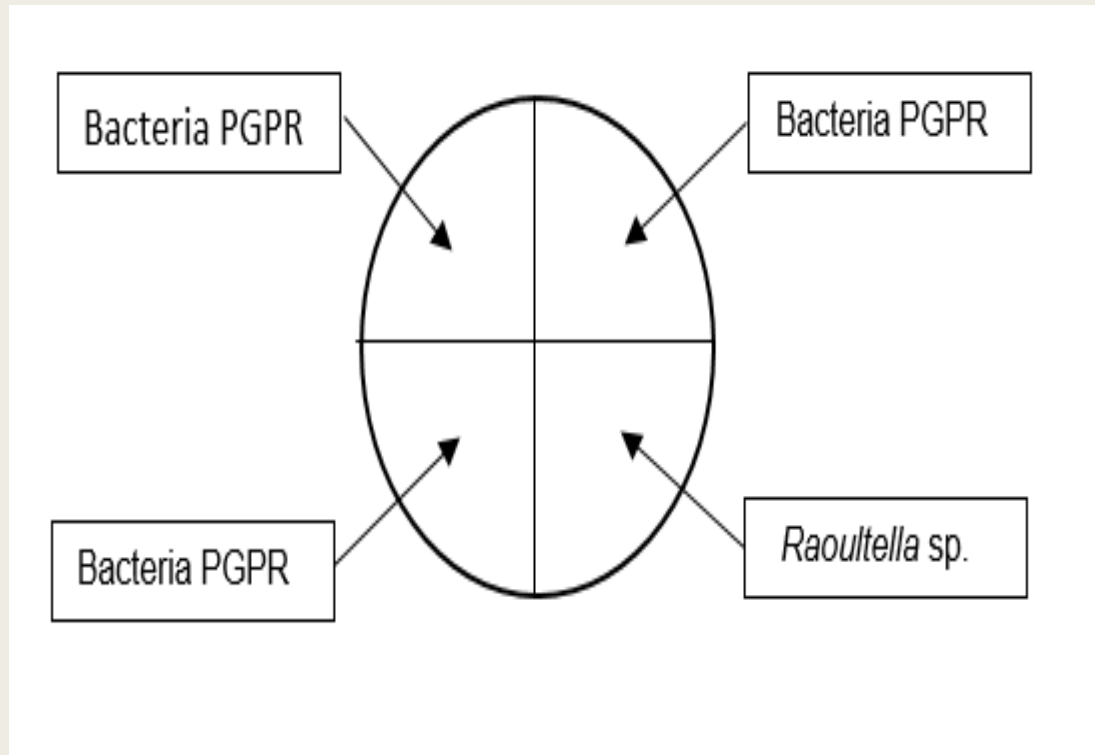


3 Obj: Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella* sp. y PGPR productora de AHLs sobre *T. solanivora*.

Compatibilidad de bacterias PGPR TN26, TN33 y TN503 *Raoultella* sp.

Bioensayo

Compatibilidad de bacterias PGPR y *Raoultella sp.*



Incubar a 30°C por
24 horas

Lectura:
Inhibición de
crecimiento sobre
Raoultella sp

Bioensayo

Preparar
formulación

Control positivo:
CHAO

Control Negativo:
formulación sin
inóculo.

Inóculo: *Raoultella*
sp

Co-inóculo:
Raoultella sp, con
Serratia
proteamaculans



Lecturas a
35 días del
montaje.
Determino
presencia
de daño por
T.
solanivora

4. Obj. Compatibilidad de *Raoultella* sp. con los insumos de síntesis química en papa.

Karate Zeon

La lambdacialotrina: actúa sobre el sistema nervioso del insecto

Fulminator 600E

Organofosforados (profenofos) y piretroides (cipermetrina): inhibidor de la colinesterasa

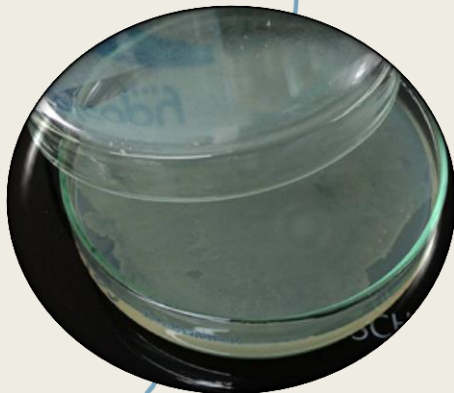
Lorsban 4E

Clorpirifos: inhibe la acción de la acetilcolinesterasa


Compatibilidad de *Raoultella* sp. con plaguicidas de síntesis química



Metódo 1: Sensidiscos con plaguicidas en agar nutritivo con *Raoultella* sp. a 5 concentraciones diferentes.



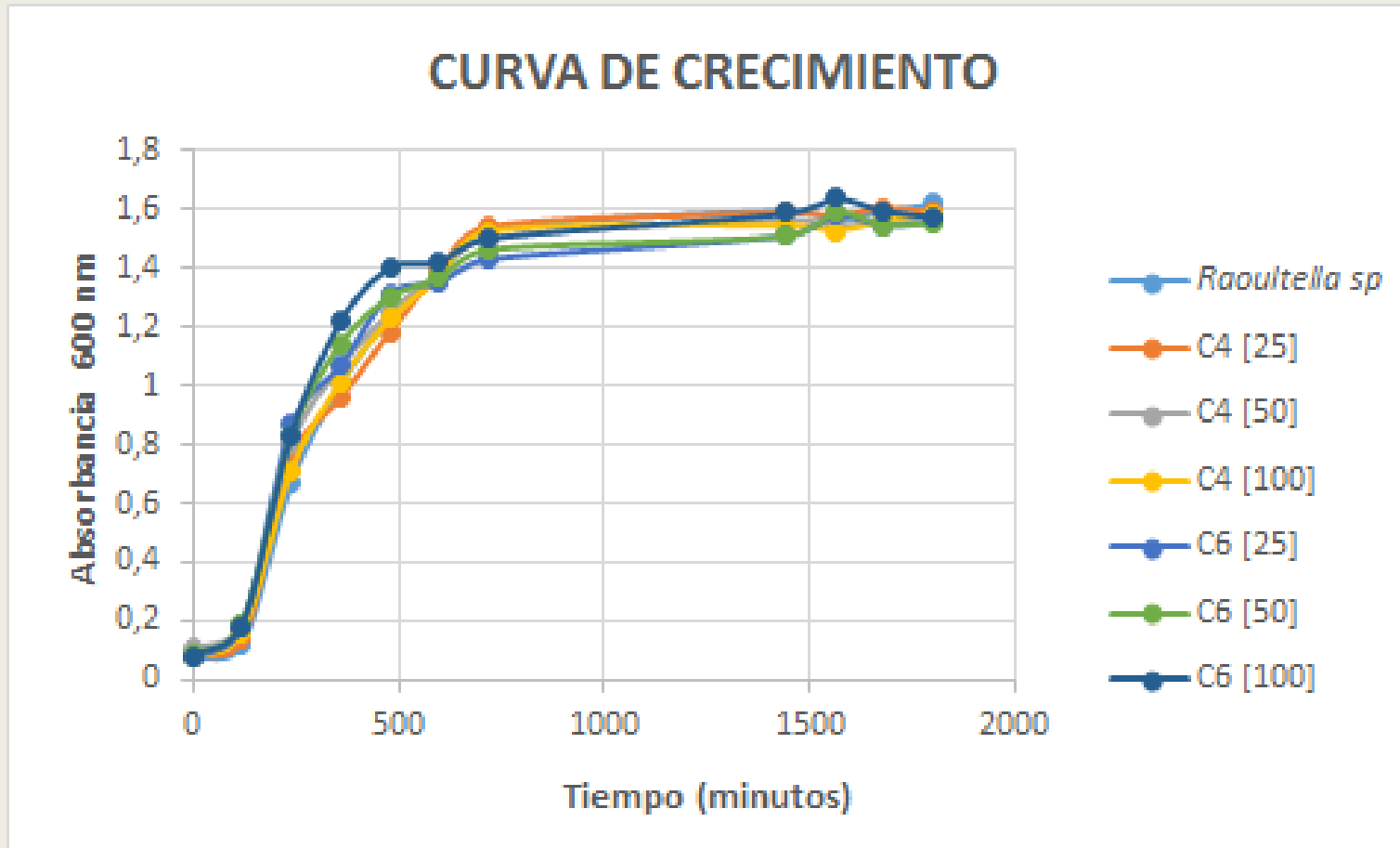
Metódo 2: Crecimiento de *Raoultella* sp. con agar nutritivo suplementado con plaguicidas

The word "RESULTADOS" is centered on the page. It is flanked by two large, black, L-shaped brackets. One bracket is on the left, with its vertical bar extending downwards and its horizontal bar extending to the right. The other bracket is on the right, with its vertical bar extending upwards and its horizontal bar extending to the left. The word "RESULTADOS" is written in a bold, black, serif font.

RESULTADOS

1ro. Definir el efecto de las AHLs sobre los mecanismos de acción.

Curva de crecimiento



Cheng et. al, (2017), no encontraron aumento en el crecimiento de *Paraccocus denitrificans* al agregarle 2 $\mu\text{mol/L}$ de C6-AHL

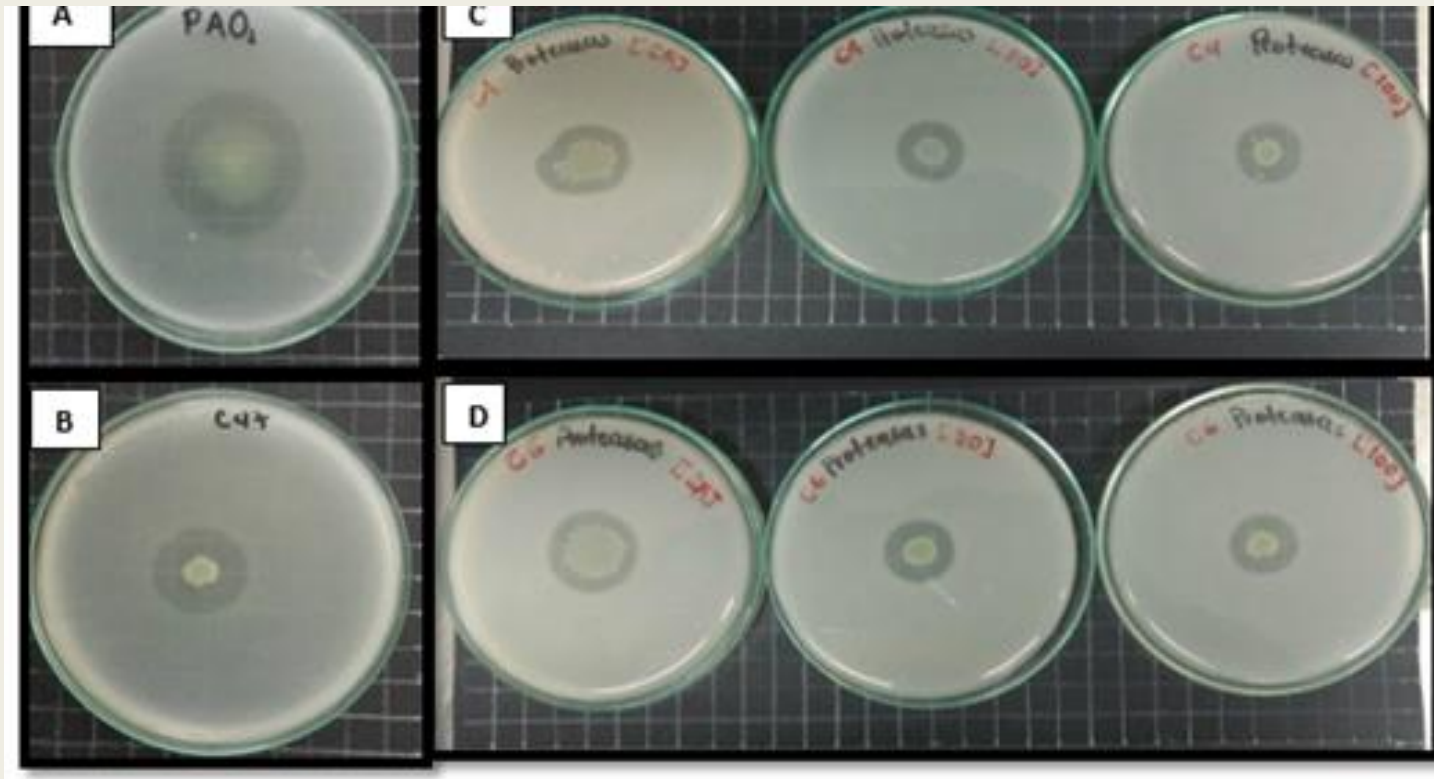
Van et. al, (2006), *Escherichia coli* suplementado con 0,5 μM de C6-AHL no se afecto.

Proteasas

CONCENTRACIÓN (nM)	Área (cm ²)	Longitud (mm)
C47	0,71 (0,09) a	5,15 (1,23) b
C4 [25]	0,75 (0,16) a	3,91 (0,92) b
C4 [50]	0,67 (0,08) a	2,87 (0,29) b
C4 [100]	0,63 (0,06) a	4,75 (1,56) b
C6 [25]	0,68 (0,08) a	4,21 (0,91) b
C6 [50]	0,66 (0,08) a	3,29 (0,57) b
C6 [100]	0,72 (0,05) a	12,67(1,75) a

Ulrich, et. al, (2004), *Burkholderia thailandesis* suplementada con AHLs exógenas (C6-AHL, C8-AHL y C10-AHL) no encontró diferencias en proteasa.

Proteasas



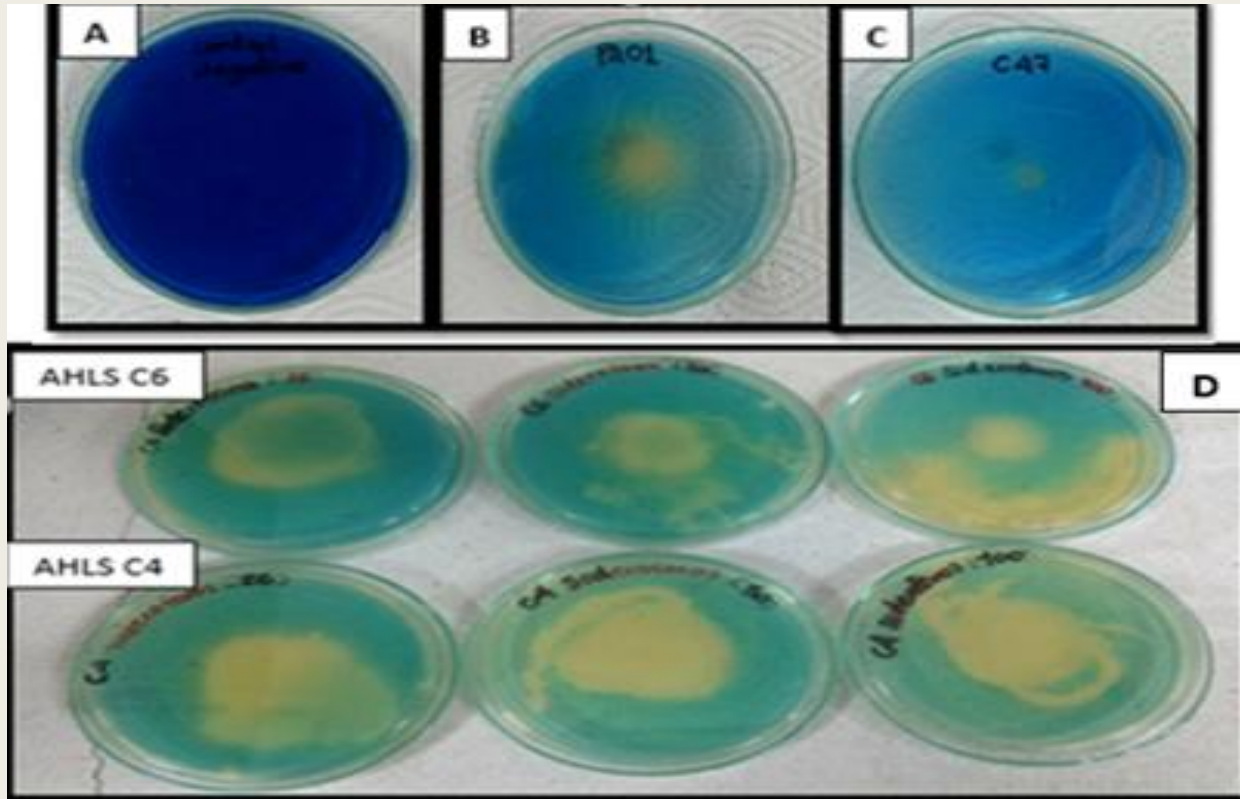
Diggle et. al, (2002), adicionaron 10 μ M de C4-AHL y 30C12-AHL a *Pseudomona aeruginosa* no encontraron diferencia frente a PA01 sin suplementar para proteasas.

Sideróforos

CONCENTRACIÓN (nM)	ÁREA (cm ²)
C47	0,76 (0,23) d
C4 [25]	2,07 (0,48) dc
C4 [50]	6,62 (0,4) c
C4 [100]	17,20 (1,77) b
C6 [25]	15,94 (1,79) b
C6 [50]	4,66 (0,97) dc
C6 [100]	30,25 (1,53) a

Ulrich, et. al, (2004), *Burkholderia thailandesis* suplementada con AHLs exógenas (C6-AHL, C8-AHL y C10-AHL).

Sideróforos



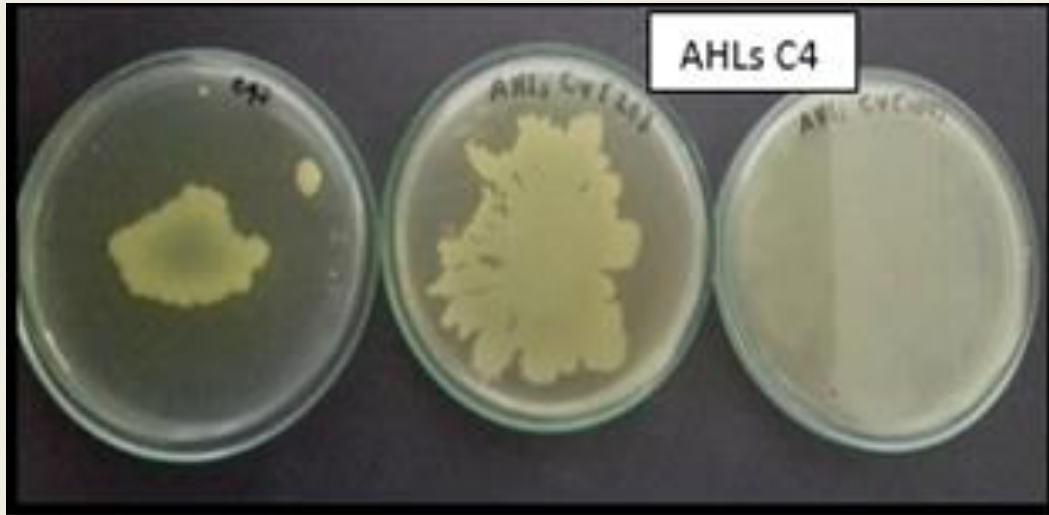
Diggle et. al, (2002), adicionaron 10 μ M de C4-AHL y 30C12-AHL a *Pseudomona aeruginosa* no encontraron diferencias en la producción de sideróforos.

Movilidad *swarming*

CONCENTRACIÓN (nM)	ÁREA (cm ²)
C47	6,67 (1,57) c
C4 [25]	31,17 (4,92) cb
C4 [100]	58,59 (7,84) a
C6 [25]	36,81 (2,23) ba
C6 [50]	46,48 (5,47) ba
C6 [100]	6,75 (3,13) c

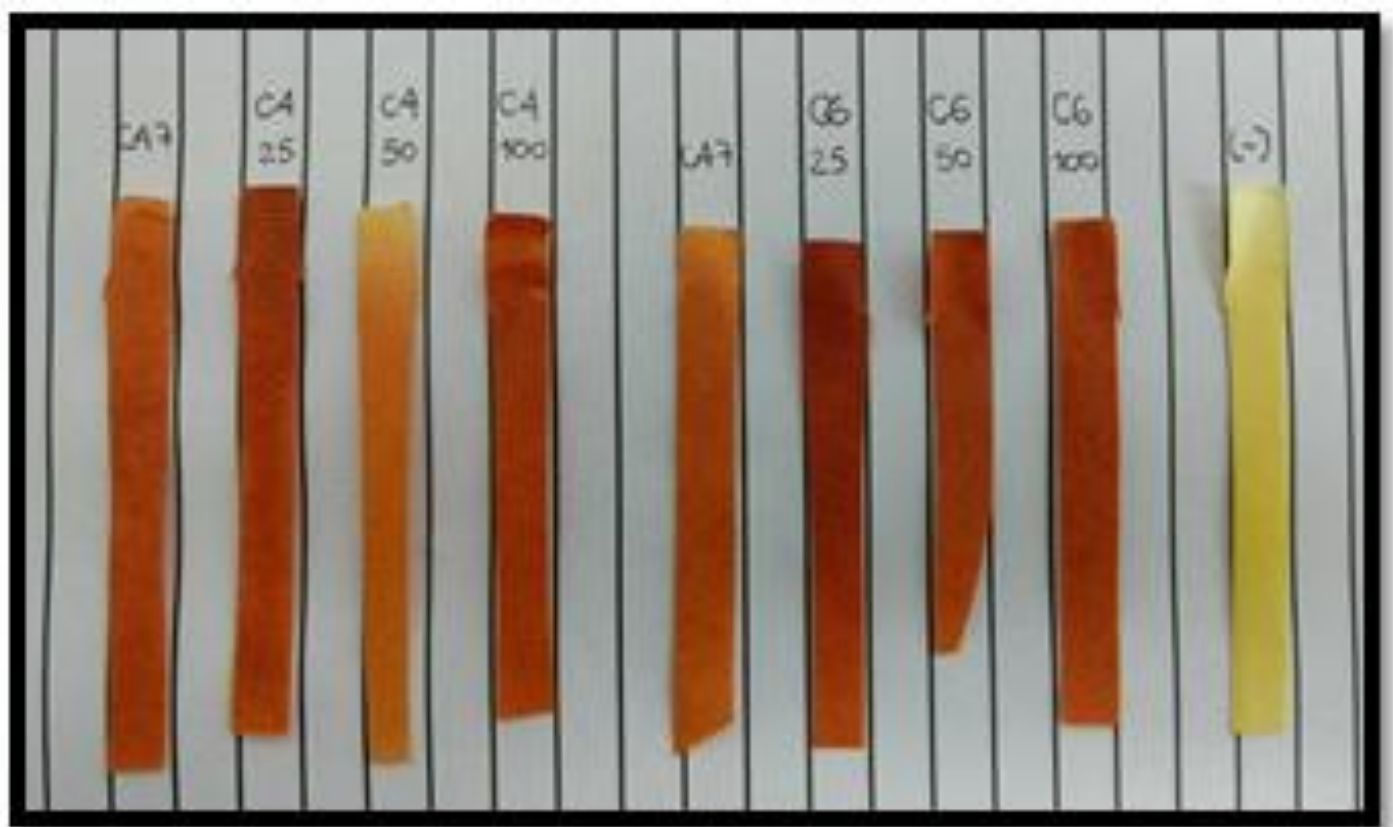
Dávila (2007), *Vibrio* aumentó el desplazamiento *swarming* con la producción de AHLs.

Movilidad *swarming*



La movilidad *swarming* es considerada como un factor de virulencia importante que permite invadir y colonizar la rizósfera.

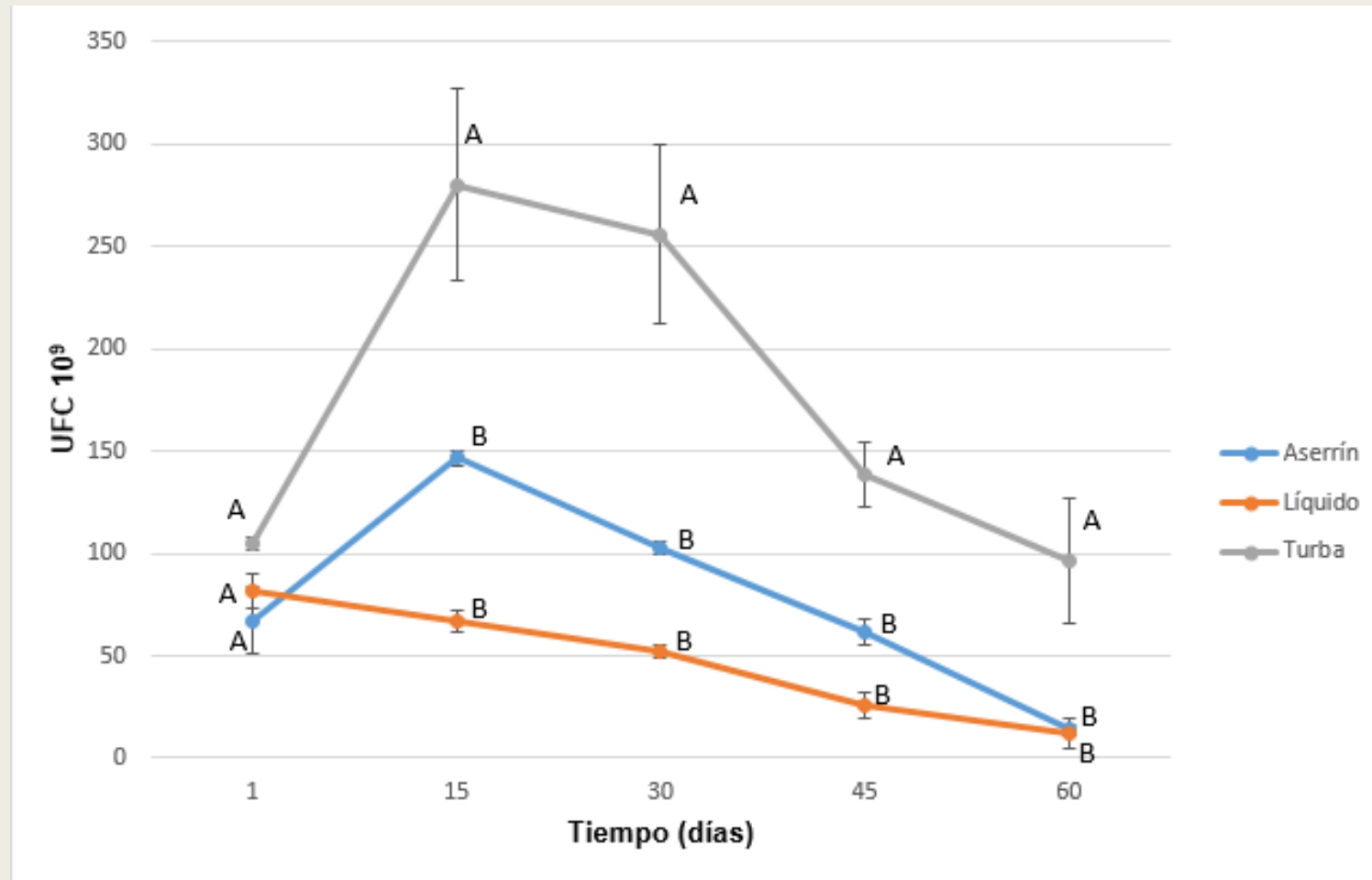
Producción de Ácido Cianhídrico (HCN)



Pessi et. al, (2001) encontraron que en *P. aeruginosa* la molécula rsmA modula la expresión de HCN a través de AHLs.

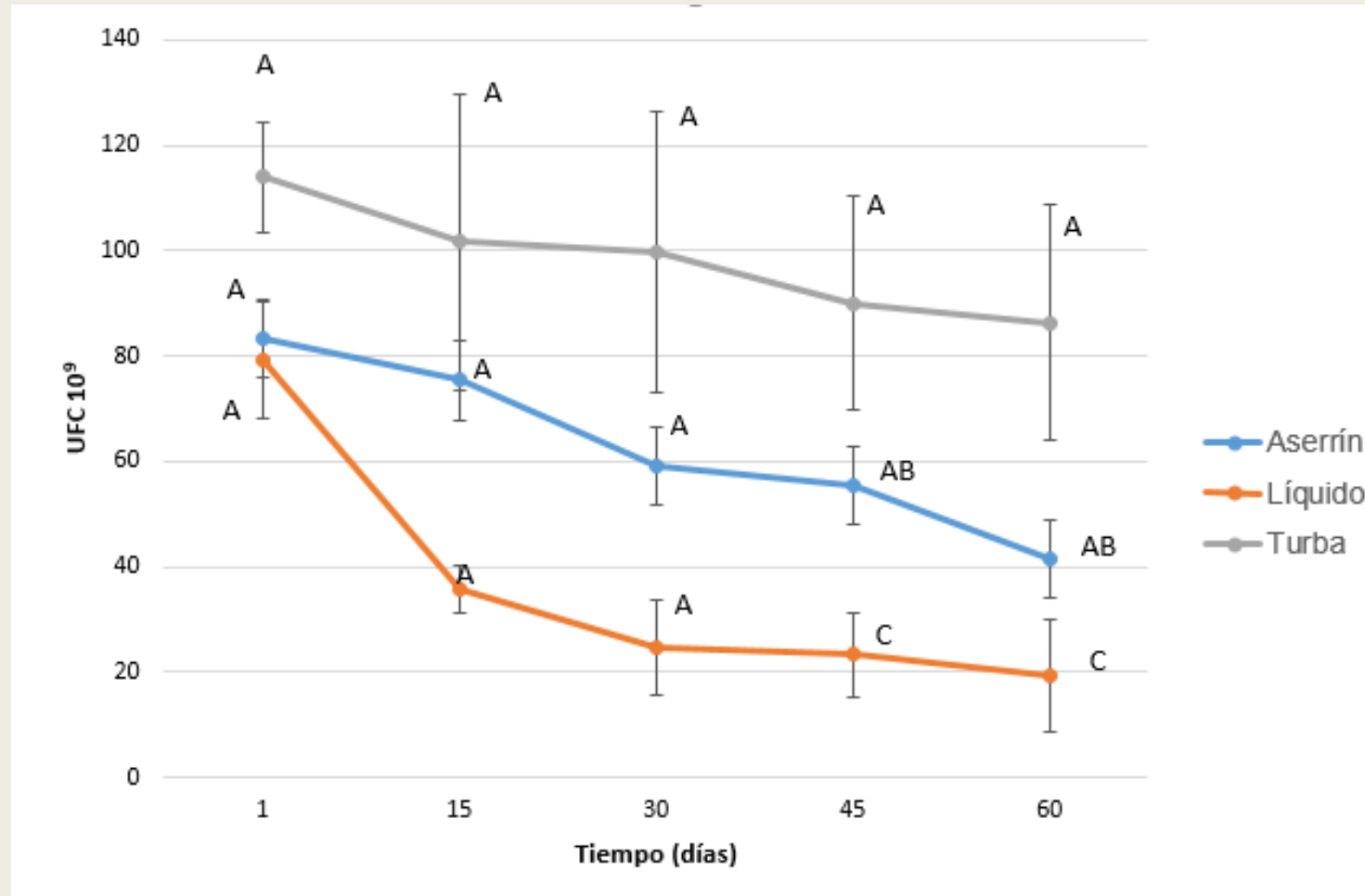
2do. Determinar la viabilidad de *Raoultella sp.* en tres transportadores.

TRANSPORTADORES A 18°C



El-Fattah et. al, (2013), *Azotobacter chroococcum* inoculado en mezcla de turba con otros transportadores orgánicos a 8°C y 30°C durante 3 meses.

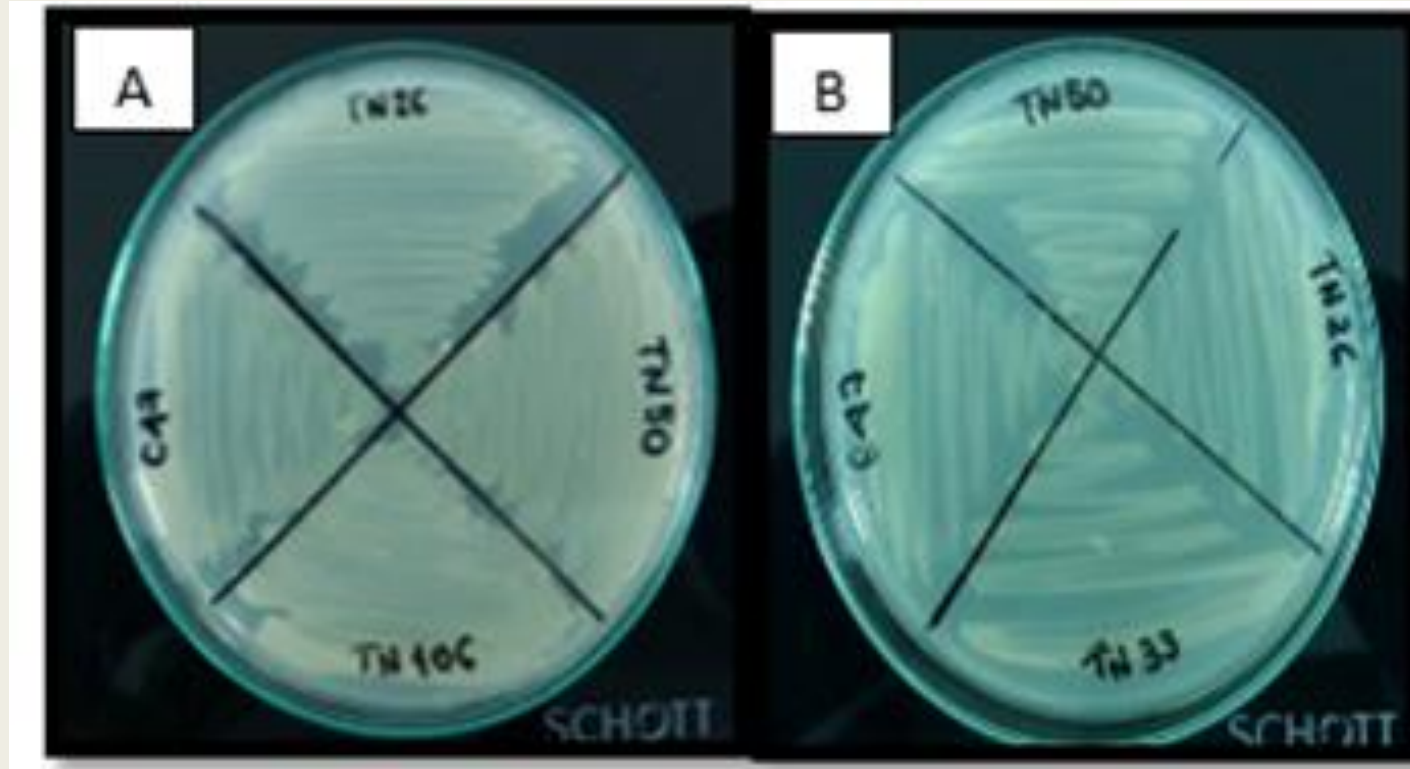
TRANSPORTADORES A 4°C



Amer et. al, (2000) La supervivencia de *Bacillus subtilis* fue mejor a 22°C y *P. putida* tuvo mejor viabilidad a ~0°C.

3ro. Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella sp.* y una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal y productora de AHLs sobre la mortalidad de *T. solanivora*.

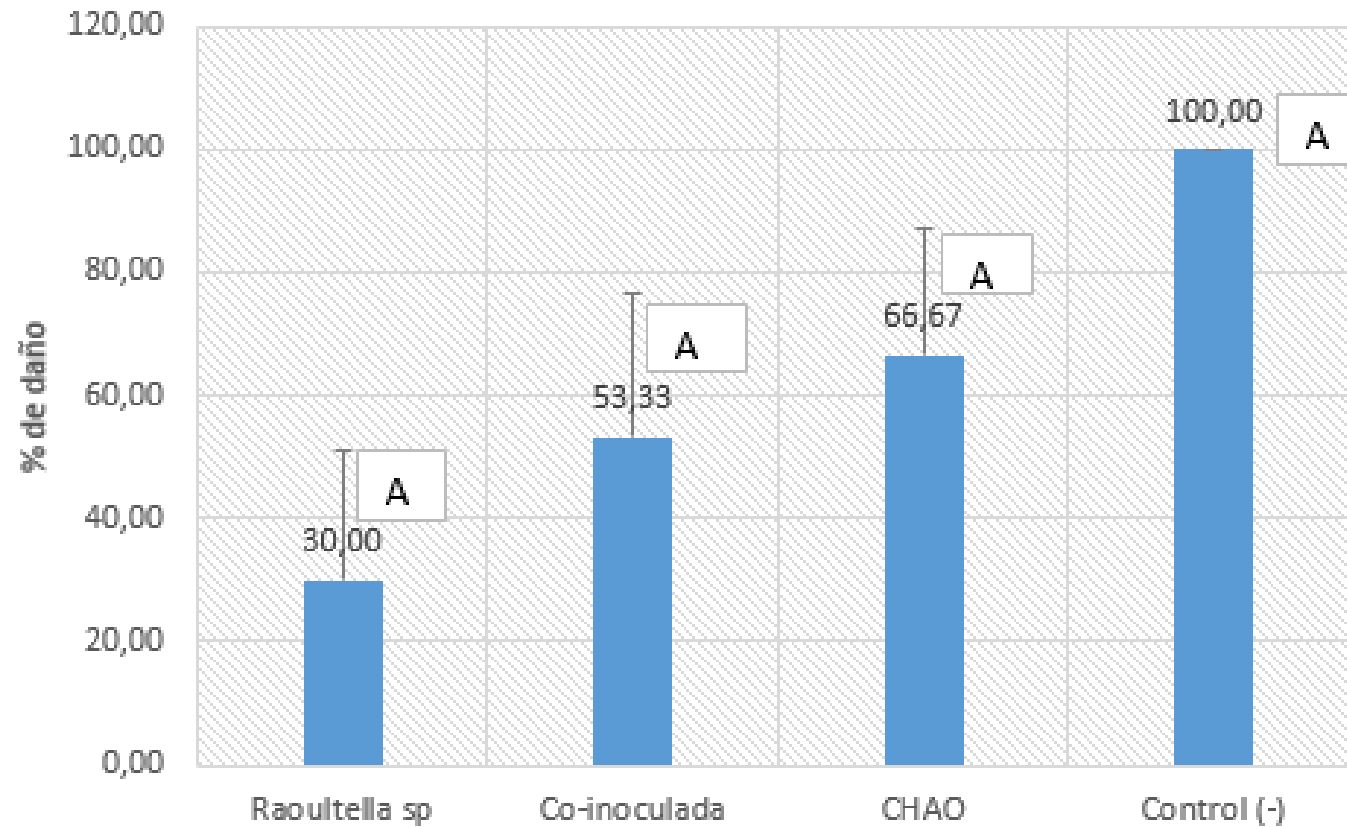
Enfrentamiento de *Raoultella sp.* con bacterias promotoras de crecimiento



Vaquero y Álvarez (2018), de 30 aislamientos de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal evaluaron el incremento de peso seco de vástago y raíz, donde tres aislamientos incrementaron más del 200% con respecto a los controles.

Serratia proteamaculans
PGPR y productora de AHLs

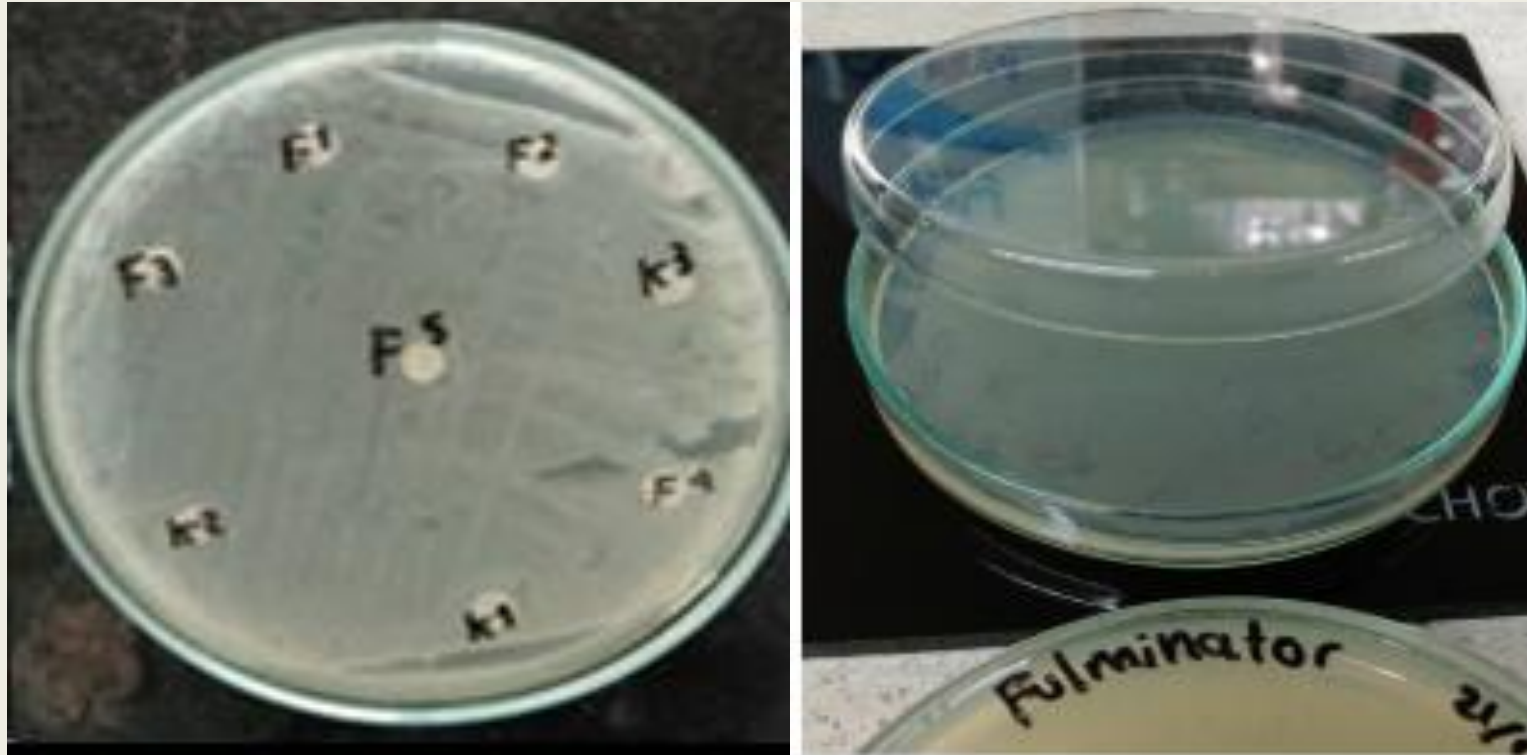
Bioensayo



Gómez et. al, (2013) formulación a base de carbonato de calcio, *Baculovirus* y *B. thurigiensis* contra *T. solanivora* en condiciones de almacenamiento (95.8%).

4to. Compatibilidad de *Raoultella sp.* con los insumos de síntesis química en papa.

Crecimiento de *Raoultella* sp. en medio suplementado con plaguicidas de síntesis química



Santos et. al, (2013) definió la importancia de la compatibilidad entre biocontroladores y plaguicidas de síntesis química.

Conclusiones

- Las AHLs influyen en los mecanismos de acción de *Raoutella* sp. como producción de sideróforos, motilidad tipo *swarming* y la producción de ácido cianhídrico.
- El transportador más efectivo para mantener la viabilidad de *Raoutella* sp. es la turba, en especial cuando se almacena a 4°C.
- *Raoutella* sola o co-inoculada no presentó una reducción significativa contra *T. solanivora*, sin embargo disminuyo el daño en un 70%.
- Se evidencio que *Raoutella* sp. y los insumos de síntesis química Lorsban, Karate Zeon y Furminator son compatibles y podrían usarse de forma coordinada para el control de insectos plaga.

Recomendaciones

- Analizar la viabilidad de *Raoultella* sp. en los tres transportadores almacenados a 4°C por un tiempo mayor a 60 días y evaluar su actividad entomopatógena en el transcurso de este tiempo.
- Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella* sp con otras bacterias productoras de AHLs para determinar la actividad entomopatógena.
- Recomendaciones para el Bioensayo: aumentar el número de replicas y evaluar diferentes absorbancias del inóculo.
- Evaluar los mecanismos asociados a la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp. co-inoculada con una bacteria productora de AHLs en un medio suplementado con insumos de síntesis química.