

NUEVO MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO Y LA CUANTIFICACIÓN DE INSECTOS DEL ORDEN COLLEMBOLA

Kalyanne Fernández, F. Fernández y E. Pérez

ABSTRACT. Recently, it has been reported that some members of the Collembola order feed from the external mycelia and propagules of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), they giving rise mainly to negative effects on the development of symbiosis. Two experiments were designed with the objective of obtaining an optimum and efficient method enabling the isolation of Collembola in soils: the first one established a comparison between the commonly used methodology for animal isolation (Tullgren/Berlese funnels) and the traditional method of AMF spore count (wet sieving and decanting). The second experiment optimized the traditional approach achieving better results. A randomized complete design was used in both cases, the first one of simple classification and the second one with bifactorial arrangement. Duncan's test at 5 % was employed to compare treatment means. It was proved that through wet sieving method, a larger number of individuals could be isolated, the best extractions being performed at a centrifugation rate of 2 000 rpm and the longest time (five minutes). This method was more advantageous, not only for significantly reducing the isolation time of individuals (five minutes vs five days), but also because it allows to quantify more alive individuals with an upper biological quality.

Key words: Collembola, arbuscular mycorrhizal fungi, insects

RESUMEN. Recientemente, se ha informado que algunos integrantes del orden Collembola se alimentan de las hifas externas y de los cuerpos de fructificación de los HMA, originando principalmente efectos negativos sobre el desarrollo de la simbiosis. Con el objetivo de obtener un método optimizado y eficiente que posibilite el aislamiento de colémbolos en suelos, se diseñaron dos experimentos: el primero estableció una comparación entre la metodología comúnmente empleada para aislar los animales (embudos Tullgren/Berlese) y el método tradicional de conteo de esporas de HMA (tamizado húmedo y decantado). El segundo consistió en la optimización de este último, que fue el que mejores resultados aportó. En ambos casos se empleó un diseño completamente aleatorizado, en el primero de clasificación simple y el segundo con arreglo bifactorial; las medias entre los tratamientos se compararon según la prueba de Duncan al 5 %. Se demostró que a través del método de tamizado podía aislarse un mayor número de individuos, realizándose las mejores extracciones con la velocidad de centrifugación de 2 000 rpm y el mayor tiempo (cinco minutos). Este método resultó más ventajoso no solo por reducir significativamente el tiempo de aislamiento de los individuos (cinco minutos vs cinco días), sino también porque permite cuantificar mayor cantidad de éstos, inclusive vivos y por tanto con mayor calidad biológica.

Palabras clave: Collembola, hongos micorrizógenos arbusculares, insectos

INTRODUCCIÓN

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) colonizan las raíces de un gran número de plantas de interés económico y presentan un enorme potencial para ser empleados en la agricultura, debido a su capacidad para promover el crecimiento de estas (1)(2).

En estos momentos, no solo es necesario el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales intervinen en el ciclado de los nutrientes, cómo contribuyen a incrementar la resistencia de las plantas al estrés hídrico, mejorar la estructura del suelo o potenciar la resistencia

contra patógenos radicales, lo cual hace posible una mejor comprensión de su papel de aliados inseparables de las plantas micótrofas, sino también es indispensable hacer un análisis que integre todos los procesos relacionados con su comportamiento, mecanismos de acción y eficiencia simbiótica (3).

Uno de los factores fundamentales en el desarrollo, la estabilidad y eficiencia micorrízica, lo constituye la comunidad biótica de la rizosfera (4)(5). Los organismos que la integran incluyen especies de muchos grupos taxonómicos, como son bacterias, hongos e invertebrados y pequeños mamíferos, los cuales muestran un sinnúmero de interacciones que varían desde mutuamente beneficiosas hasta perjudiciales (6).

Algunos microartrópodos y nemátodos han recibido atención especial, debido al daño que pueden causar a las poblaciones de estos hongos (7).

Kalyanne Fernández y E. Pérez, Investigadores; Dr.C. F. Fernández, Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Oribatei (*Acaros: Cryptostigmata*) y Collembola (Insectos: Apterygota) son los dos grupos más ricos en especies y en número de individuos de la fauna edáfica, constituyendo del 72 al 97 % del total de los artrópodos de suelo (8).

Recientemente, se ha informado que algunos integrantes del orden Collembola se alimentan de las hifas externas y los cuerpos de fructificación (9), lo cual puede originar efectos negativos, principalmente sobre el desarrollo de la simbiosis, dependiendo del tamaño de sus poblaciones (10).

Algunos autores han realizado estudios aún más profundos y han aportado resultados concretos, que confirman la presencia de fragmentos hifales en el intestino de los colémbolos (11).

La metodología que generalmente se emplea en la actualidad para aislar y cuantificar estos insectos de las muestras de suelo, es la de extracción por embudos Tullgren/Berlese. Dicho procedimiento demora entre cuatro y cinco días para aislar los ejemplares, pues está basado en la migración provocada de estos organismos.

En nuestro centro se emplea la técnica de tamizado húmedo y decantado para realizar los aislamientos y el conteo de esporas de HMA y en sucesivas ocasiones se han encontrado numerosos individuos pertenecientes a la microfauna edáfica en las placas de conteo, como consecuencia del método extractivo.

Por todo lo expuesto, el propósito de este trabajo fue desarrollar, a partir del uso de la técnica antes mencionada, un método eficiente que posibilite el aislamiento de colémbolos en suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para dar respuesta al objetivo, se realizaron dos experimentos en el Laboratorio de Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, los cuales se detallan a continuación: *Experimento 1. Comparación de dos métodos para el aislamiento y la cuantificación de colémbolos en suelos.* Este experimento se realizó en octubre de 1998, bajo un diseño completamente aleatorizado. Para realizarlo se tomaron 10 muestras de suelo Ferralítico Rojo (12) a 5 cm de profundidad, en una plantación de mango (*Manguiфера indica*) situada en el propio centro.

Después de obtenido el material, se procedió al montaje de las variantes estudiadas en cada método, para lo cual se separaron cuatro submuestras (50 g) de cada muestra, y se sometieron a los siguientes tratamientos:

- ★ Técnica de extracción por embudos Tullgren/Berlese¹ en presencia de fuente luminosa (Figura 1).
- ★ Técnica de extracción por embudos Tullgren/Berlese en ausencia de fuente luminosa.
- ★ Técnica de tamizado húmedo y decantado (5) con tamiz superior de 0.4 mm. En este método se aplican velocidades y tiempos de centrifugación de 2 000 rpm y cinco minutos, respectivamente.
- ★ Técnica de tamizado húmedo y decantado con tamiz superior de 1.0 mm.



Figura 1. Diagrama representativo del montaje de la técnica de extracción por embudos Tullgren/Berlese

Luego de aislados los individuos deseados, se realizó su conteo en todas las réplicas de cada variante.

En el caso de los tratamientos 3 y 4, se pudieron cuantificar los colémbolos minutos después de realizado el muestro; sin embargo, en las variantes 1 y 2, donde se empleó la técnica de extracción por embudos, fue necesario esperar cinco días para lograr recuperar y contar los ejemplares aislados. Todo este proceso se repitió con variantes similares.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con posterior prueba de Duncan al 5%. *Experimento 2. Optimización del mejor método obtenido en el experimento anterior.* Después de determinada la tecnología más factible a emplear en nuestro laboratorio, se procedió a ejecutar un segundo experimento, con el propósito de optimizar el procedimiento. Este se realizó con un diseño completamente aleatorizado bajo un arreglo bifactorial, en el cual se analizaron diez muestras por cada una de las combinaciones.

Dicho experimento se llevó a cabo en dos condiciones edafoclimáticas diferentes; una, en la cual se favorecería la cantidad de colémbolos y otra, en la cual existirían condiciones desfavorables para el desarrollo de dichos insectos, por realizarse en época seca.

Se estudió la influencia de dos factores (velocidad de giro de la centrífuga y tiempo de centrifugación) sobre el número total de individuos extraídos de la muestra. En este experimento se utilizó un tamiz superior de 1.0 mm, en sustitución del tamiz de 0.4 mm, usualmente empleado en la técnica de tamizado y decantado.

Las variantes experimentales fueron las siguientes:

- ⇒ Velocidad de centrifugación
 - 1000 rpm
 - 2000 rpm
 - 3000 rpm
- ⇒ Tiempo de centrifugación
 - 3 minutos
 - 4 minutos
 - 5 minutos

para un total de nueve tratamientos.

¹ Barros, comunicación personal, 1998

Las muestras correspondientes a la situación menos propicia (sitio 1) se tomaron en abril de 1999, de la región de Tope de Collantes (CanCan), Sancti Spíritus, específicamente en plantaciones de café sobre suelo Ferralítico Rojo Amarillento lixiviado de montaña (12).

En el caso específico del sitio 2 ó más favorable, las muestras se tomaron en junio de este año, de los canteros multiplicadores de hongos micorrizógenos bajo el cultivo de *Braquiaria decumbens*, ya que no solo el régimen de lluvias y el riego complementario contribuirían positivamente al desarrollo y la proliferación de los colémbolos, sino también la abundancia de estos hongos en el sustrato, los cuales forman parte de las fuentes de alimentación de dichos insectos (10).

Todos estos resultados se procesaron estadísticamente mediante un ANOVA, con posterior prueba de Duncan al 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de extracción por embudos Tullgren/Berlese es utilizado actualmente en la mayoría de los laboratorios de fauna de suelo, no solo con el objetivo de coleccionar y estudiar los organismos del orden Collembola, sino también otros artrópodos como ácaros y pseudoescorpiones, entre otros.

En este trabajo se comparó dicho método con el empleado comúnmente para la extracción y el conteo de esporas de hongos micorrizógenos. Los principales resultados se detallan a continuación y serán discutidos a partir del análisis de cada uno de los experimentos realizados.

Experimento 1. Comparación de dos métodos para el aislamiento y la cuantificación de colémbolos en suelos. En la Tabla I se detallan los resultados de este experimento, observándose claramente diferencias significativas entre los tratamientos estudiados.

Tabla I. Número de individuos colectados por tratamiento en cada muestreo del experimento 1

| Tratamientos | Número de individuos primer muestreo | Número de individuos segundo muestreo |
|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 4.00 b | 10.25 b |
| 2 | 1.75 b | 6.50 c |
| 3 | 24.00 a | 12.75 b |
| 4 | 25.25 a | 18.50 a |
| ES x | 3.5*** | 3.90*** |
| CV % | 25.0 | 24.00 |

Medias con letras comunes no difieren significativamente, según Dócima de Duncan para $p \leq 0.05$

Método de extracción por embudos (con iluminación)

Método de extracción por embudos (sin iluminación)

Método de tamizado y decantado (0.4 mm)

Método de tamizado y decantado (1.0 mm)

No solo se pudieron apreciar notables diferencias entre ambos métodos empleados, encontrándose un número significativamente mayor de individuos mediante la técnica de tamizado húmedo y decantado, sino también en los valores absolutos de un muestreo respecto al otro, lo cual no debe sorprender si se toma en consideración que las poblaciones estudiadas están presentes de forma natural en el suelo muestreado y su comportamiento está estrechamente relacionado con las condiciones edafoclimáticas imperantes en el momento de la colecta.

Al analizar en los tratamientos 1 y 2 el efecto de la iluminación sobre el número de individuos colectados, se constató una ligera influencia de este factor sobre dicha variable. La migración de colémbolos resulta indiferente ante la presencia o no de una fuente luminosa externa², aunque se plantea que desde el punto de vista ecológico (13), estos organismos tienen un marcado fototropismo negativo, lo cual explica su traslación en dirección contraria a la luz, fenómeno en el cual se basa precisamente la metodología de colecta por embudos Tullgren/Berlese y que de hecho se comprobó en estos resultados.

Por otra parte, cuando se estudió la extracción de estos organismos a través del tamizado húmedo y decantado, se pusieron de manifiesto diferencias entre los tratamientos 3 y 4, observándose un ligero incremento en las cantidades de individuos aislados, relacionados con el mayor calibre del tamiz superior empleado (1.0 mm).

Evidentemente, esto se debió a la talla de dichos organismos, los cuales pueden alcanzar hasta 3 mm e inclusive algunas especies del mismo orden superan este valor en algunas unidades (14); por lo tanto, un aumento en el diámetro del tamiz potencia la extracción de un mayor número de individuos, garantizando que los de gran tamaño puedan atravesar la malla con facilidad.

El análisis de los resultados reveló la utilidad y aplicabilidad de la técnica de tamizado en la extracción y el aislamiento de suelos, de organismos del orden Collembola, pudiéndose apreciar un rango de incremento desde 1.8 hasta 6.3 en el número de individuos colectados, cuando se comparan las dos mejores variantes (1 y 4) de cada método (Tabla I).

Experimento 2. Optimización del mejor método obtenido en el experimento anterior. Tomando en cuenta los resultados alcanzados con la metodología del tamizado húmedo y decantado, la propuesta era optimizar la extracción de Colémbolos a partir del estudio de diversas velocidades y tiempos de centrifugación, sobre presuntas poblaciones de alto y bajo número de estos insectos.

En la Tabla II se pueden apreciar los resultados del empleo de dichas variantes, encontrándose diferencias significativas entre todos los tratamientos analizados.

² Díaz (comunicación personal, 1998)

Tabla II. Efecto de la velocidad y el tiempo de centrifugación sobre la extracción de colémbolos. Método de tamizado húmedo y decantado

| Condiciones de muestreo | Velocidad de centrifugación (rpm) | Tiempo de centrifugación (minutos) | Número de individuos |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| 1 | 1000 | 3 | 0.83 b |
| | | 4 | 1.33 b |
| | | 5 | 2.83 b |
| | 2000 | 3 | 1.33 b |
| | | 4 | 6.83 a |
| | | 5 | 8.83 a |
| ES x CV (%) | | | 0.5375*** 46.47 |
| 2 | 1000 | 3 | 5.66 d |
| | | 4 | 8.66 cd |
| | | 5 | 10.50 cd |
| | 2000 | 3 | 16.66 c |
| | | 4 | 33.66 b |
| | | 5 | 57.83 a |
| ES x CV (%) | | | 2.4821*** 27.53 |

Medias con letras comunes no difieren significativamente, según Dócima de Duncan para $p \leq 0.05$

Un aspecto interesante resultó ser la velocidad de centrifugación empleada. Se estudiaron tres velocidades diferentes: 1 000, 2 000 y 3 000 rpm, desechándose esta última debido a que provocaba la total destrucción de los organismos una vez finalizado el proceso y por lo cual no se presentan estos datos en dicha tabla.

En ella puede observarse que, de forma general, los mayores valores absolutos de número de individuos se alcanzaron con la velocidad de centrifugación de 2 000 rpm, difiriendo significativamente de la otra variante estudiada (1 000 rpm). Todo parece indicar que esta velocidad es o resultó adecuada para extraer con mayor calidad y precisión dichos organismos, de acuerdo con su peso.

Además, al estudiar los tiempos de centrifugación, se obtuvo la mayor cantidad de individuos, en la totalidad de los casos, con el mayor tiempo (cinco minutos), con independencia de las condiciones de colecta y la velocidad empleada, alcanzándose el mayor valor en el tratamiento correspondiente al sitio 2, con 2 000 rpm y cinco minutos de centrifugación.

Los resultados obtenidos fueron marcadamente diferentes en las dos condiciones muestreadas, corroborándose la existencia de variaciones en las poblaciones de colémbolos relacionadas con el número de individuos, obteniéndose las mayores cantidades de estos insectos asociados al área de canteros multiplicadores de HMA, en la cual encuentran condiciones muy favorables para su desarrollo y supervivencia, dadas por el régimen de humedad de estos y por la existencia de altas poblaciones de dichos hongos.

Relacionados con lo anterior están los resultados expuestos por algunos autores (15)(16)(17), quienes informaron el decisivo papel que juega la humedad en el grado de distribución, la reproducción y migración de los

colémbolos. Estos indicaron que el déficit de agua en los suelos produce incrementos en el índice de migraciones y aumentos sustanciales en la tasa de mortalidad de estos organismos.

A modo de conclusión, se puede aseverar la presencia de una nueva vía para la determinación de colémbolos, la cual amplía el alcance de la técnica de tamizado húmedo y decantado, constituyendo una nueva metodología para estos fines capaz de extraer con efectividad y eficiencia estos insectos del suelo, reduciendo el tiempo de obtención de los resultados de cuatro días a unos pocos minutos.

Además, su empleo puede constituir una herramienta útil a los zoólogos, pues brinda la posibilidad de obtener ejemplares vivos para su posterior estudio biológico, a diferencia del método comúnmente empleado, en el cual se obtienen los individuos muertos en frascos colectores conteniendo alcohol (70°).

REFERENCIAS

1. Fernández, F., *et al.* The effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on rice (*Oryza sativa*) in different types of soils. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 5-9.
2. INCA. Efecto de las aplicaciones del Biofertilizante EcoMicâ en cultivos de interés económico, durante el período 1990-1998. [Informe de Investigaciones INCA]. La Habana, 1999, 45 p.
3. Siqueira, J. O. y Franco, A. A. Biotecnología do solo. Fundamentos e Perspectiva. Brasília, D.F: MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, 1988, 235 p.
4. Garbaye, J. Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*, 1991, vol. 47, p. 370-375.
5. Herrera, R. A., *et al.* Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales (Eds. Maximina Monasterio). Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, 1995.
6. Linderman, R. G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En Bethlenfalvay G. J., Linderman RG (eds). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison : ASA, 1992, p. 45-70, .
7. Chanway, C. P. Turkington, R. y Holl, F. B. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. *Adv. Ecol. Res.* 1991, vol. 21, p. 122-170.
8. Heisler, C. Erfassung der Collembolen und Milbenfauna einer Ackerfläche. *Zoologischer Anzeiger*, 1989, vol. 223, no. 3/4, p. 239-248.
9. Guerrero, E., *et al.* Micorrizas. *Recursos biológicos del suelo*, 1996, p. 47-61.
10. Fitter, A. H. y Garbaye, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil*. 1994, vol. 159, p. 123-132.
11. Warnock, A. J., *et al.* The influence of a springtail *Folsomia candida* (Insecta, Collembola) on the mycorrhizal association leek *Allium porrum* and the vesicular-arbuscular mycorrhizal endophyte *Glomus fasciculatum*. *New Phytol.*, 1982, vol. 90, p. 285-292.

12. Hernández, A. J., *et al.* Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos, 1995.
13. Barnes, D. R. Quelicerados. En su Zoología de los invertebrados II, 1986, p. 683-693.
14. Sautter, K. D y Santos, H. R. Recuperacao de solos degradados pela mineracao de xisto, tendo como bioindicadores insetos da Ordem Collembola. *Revista do Setor de Ciencias Agrarias*, 1998, vol. 11, no. ½, p. 85-91.
15. Butcher, J. W., *et al.* Bioecology of edaphic Collembola and Acarina. *Annual Review of Entomology*, 1971, vol. 16, p. 249-288.
16. Wallwork, J. A. The distribution and diversity of soil fauna. London: *Academic Press*, 1976, 355p.
17. Perdue, J. C. y Crossley, D. A. Seasonal abundance of soil mites (Acari) in experimental agroecosystems: Effects of drought in no-tillage and conventional tillage. *Soil & Tillage Research*, 1989, vol. 15, p.117-124.

Recibido: 19 de julio de 1999

Aceptado: 24 de septiembre de 1999

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

FITOTECNIA

CURSO DE VERANO

**PRODUCCIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR
CON BAJOS INSUMOS**

Fecha: 2-6 /agosto

Duración: 40 h

Precio: 320.00 USD



Para más información diríjase a:

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones
Públicas
Instituto Nacional de Ciencias
Agrícolas(INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Tel: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64) 6-3867
e-mail: posgrado@inca.edu.cu