

La introducción de cilindros de vidrio y mallas plásticas en olfatómetro facilita ensayos de comportamiento de nematodos entomopatógenos

The introduction of glass cylinders and plastic nets in olfactometers facilitates the entomopathogenic nematode behaviour tests



<http://opn.to/a/OdPDh>

Giselle Calabuche-Gómez ¹, Roberto Enrique Regalado ², Lidia López Perdomo ²

¹Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Se evaluó la adecuación de un olfatómetro, al que se le introdujeron un cilindro de vidrio y mallas plásticas para evitar el desplazamiento de las larvas del insecto diana a evaluar, permitiendo determinar la capacidad de desplazamiento e infección de los juveniles infectivos (JI) de nematodos entomopatógenos en experimentos en laboratorios. Para estos ensayos se utilizaron JI de la cepa HC1 de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.*, recién emergidos y con 100 % de viabilidad. Para el montaje del dispositivo de dos cámaras, se utilizaron partes de un olfatómetro de seis brazos, cilindros de vidrio, mallas plásticas y arena sílice esterilizada al vapor como sustrato con 10 % de humedad. Las larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L.), utilizadas como insectos diana, procedían de una cría de laboratorio y tenían 200 mg de peso, aproximadamente. Al sustrato se le aplicó una suspensión que contenía 2000 JI en el extremo opuesto al tubo de PVC donde se situaron las larvas de *G. mellonella*; estas se mantuvieron en cilindros protegidos con malla plástica para evitar su desplazamiento. Se prepararon tres réplicas que se mantuvieron a 27°C. Se realizaron observaciones a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación de los nematodos y se registró la mortalidad de las larvas. Con el ensayo del olfatómetro se comprobó la movilidad de los JI, los cuales recorrieron 19,5 cm en 60 horas. La mortalidad de las larvas de *G. mellonella* fue de 84,7 %. El olfatómetro de dos cámaras, con la introducción de cilindro de vidrio y malla plástica, resultó útil para los estudios del efecto de factores abióticos sobre el comportamiento de los nematodos entomopatógenos en el laboratorio.

Palabras clave: Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos, control biológico, *Heterorhabditis amazonensis*.

ABSTRACT: It was evaluated the adequacy of an olfactometer, to which a glass cylinder and a plastic net were introduced to avoid displacement of the target insect larvae, allowing determining displacement and infection capacity of infective juveniles (IJ) of entomopathogenic nematodes in laboratories trials. For these assays, recently emerged IJ with 100 % viability of the strain HC1 of *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* were used. For the assembly of the two branches device, some parts of a six arms olfactometer, glass cylinders, plastic meshes, and, as substrate, sterile silica sand with 10 % of humidity were used. The last instar larvae of *Galleria mellonella* (L.) use as the target insect came from a laboratory rearing and weighed about 200 mg. A 2000 IJ suspension was applied to the substrate on the end opposing to the PVC tube in which the *G. mellonella* larvae were kept in a glass cylinder protected with a plastic net to avoid their movement. Three replicas were kept at 27°C. Larval mortality was recorded at 24, 48, and 72 hours after nematode application. With the olfactometer assay, e it was checked mobility of IJ, which moved along 19.5 cm in 60 hours. Mortality of *G. mellonella* larvae reached 84.7 %. The two-branch olfactometer with the introduction of a glass cylinder and a plastic net, was useful for laboratory studies related to the effect of abiotic factor on entomopathogenic nematodes.

Key words: biological control, Entomophage and Entomopathogenic Reproduction Centers, *Heterorhabditis amazonensis*.

*Autor para correspondencia: Giselle Calabuche-Gómez. E-mail: gisellecg@censa.edu.cu

Recibido: 23/09/2019

Aceptado: 12/11/2019

Los nematodos entomopatógenos constituyen agentes de control biológico de amplio uso a escala internacional y se aplican como ingredientes activos en productos comerciales y biopreparados (suspensiones acuosas); sin embargo, se conoce que la eficacia de las aplicaciones depende, entre otros elementos, del desempeño particular de las especies y cepas utilizadas (1).

En el estudio de especies/cepas se debe tener en consideración lo señalado por Ishibashi y Kondo (2) acerca de que hay dos componentes importantes en el comportamiento de los nematodos entomopatógenos: la búsqueda del hospedante y la penetración; la infección no se produce si los nematodos no hallan al hospedante, lo que es “mediado” por señales químicas seguido de la penetración. Estos nematodos poseen dos estrategias básicas para encontrar al hospedante, algunas especies manifiestan el tipo de “espera pasiva” (*ambusher*), en la que los individuos permanecen cerca o en la superficie del suelo e infectan a los insectos móviles que se alimentan en esas zonas, y otras especies que tienen una estrategia de “búsqueda activa” (*cruiser*) y son capaces de desplazarse y buscar sus hospedantes (3).

Heterorhabditis amazonensis Andaló *et al.* cepa HC 1 (GenBank: BankIt1899363 Hamaz_HC1 KU870321) posee la segunda estrategia de búsqueda (4). En Cuba, más de 30 laboratorios reproducen esta cepa y diversas universidades y centros de investigación realizan estudios con aislamientos de *Heterorhabditis* y *Steinernema* (5); sin embargo, no todos poseen equipos que puedan ser utilizados en los estudios para determinar la movilidad de los juveniles infectivos, como uno de los atributos más importantes que deben poseer estos organismos para lograr su uso eficaz en el manejo de plagas en campo, en especial las que actúan en ambientes protegidos y galerías.

Numerosos estudios, a escala internacional, utilizaron olfatómetros de diversos tipos para estudiar el desplazamiento de especies/cepas de nematodos entomopatógenos con diferentes objetivos (6,7,8); sin embargo, una parte importante de los laboratorios del país carecen de estos dispositivos.

El objetivo de este trabajo fue realizar algunas adecuaciones a un olfatómetro de seis brazos para estudios de laboratorio, ofreciendo los detalles para que pueda ser construido en laboratorios del país con los materiales disponibles.

El olfatómetro de seis brazos fue descrito, originalmente, por Rasmann *et al.* (7). Se construyó de vidrio, con una cámara central que se conecta a seis brazos distribuidos equidistantemente, cuyo extremo final posee un contenedor de vidrio con arena blanca estéril.

Teniendo como base la descripción de estos autores y la información recopilada de los investigadores (7), en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile construyeron olfatómetros con tubos de PVC de diferentes diámetros. Uno de ellos fue donado, gentilmente, a nuestro laboratorio. (Fig. 1)

Para las evaluaciones se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* L. (de unos 200 mg de peso) y juveniles infectivos de *H. amazonensis* obtenidos en el laboratorio según los procedimientos establecidos (4,9).

Para evaluar el desplazamiento horizontal de los JI de nematodos entomopatógenos se estructuró, a partir del olfatómetro de seis brazos donados por la Universidad de Chile, un olfatómetro de dos cámaras (7,5 cm de diámetro y 9 cm de profundidad) conectadas por dos brazos fijos (4,5 cm de longitud y 2,1 cm de diámetro) y un intermedio desmontable (5,0 cm de longitud y 2,1 cm de diámetro) (Fig. 2), al que se le puede ajustar su longitud para determinar el desplazamiento horizontal de las cepas a disímiles distancias en tiempos determinados por los evaluadores, en dependencia de los objetivos de los estudios que se ejecuten.

Para todas las pruebas se usó arena sílice con 10 % de humedad (según las normas ISO 11465:1993), esterilizada al vapor en una autoclave (MEDEXPORT BK-75) por 2 h a 121°C y 1,1 atmósferas.

En las evaluaciones efectuadas en el laboratorio, cada cámara recibió una capa de arena sílice estéril de entre 4-5 cm, y hasta la mitad del diámetro, en el caso de los brazos conectores (Fig. 3A) y de las columnas de vidrio que se describen a continuación.

En una de las cámaras del olfatómetro se



Figura 1. Olfatómetro de seis brazos construido con tubos de PVC de diferentes diámetros en la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, utilizando las especificaciones dadas por Rasmann *et al.* (7) y con autorización de esos autores.¹ / Custom-made six-arm olfactometer with PVC pipes of different diameters made at the Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile, using the specifications given by Rasmann *et al.* (7) and with the authorization of those authors.¹



A.



B.

Figura 2. A. Brazo fijo de una de las cámaras conteniendo arena sílice estéril. B. Larvas de *G. mellonella* contenidas dentro de la columna de vidrio rellena de arena sílice estéril con 10 % de humedad / A. Fixed arm of one of the chambers containing sterile silica sand. B. Larvae of *G. mellonella* contained within the glass column filled with sterile silica sand with 10 % humidity.

colocó una columna de vidrio (5,0 cm largo y 4,0 cm diámetro). Esta columna posee, en el extremo opuesto al tubo que conecta las dos cámaras, un disco de plástico que la sella y en la superficie próxima al tubo conector se colocó una malla plástica de 3000 μm (Fig. 3B) y en su interior se colocaron 10 larvas de *G. mellonella*.

Para determinar la capacidad de desplazamiento de los JI de nematodos entomopatógenos provenientes de ensayos de

laboratorio, se aplicaron 2000 JI de *H. amazonensis* en la superficie de arena de la cámara opuesta a la que contenía el tubo de vidrio con las larvas del insecto. Se prepararon tres réplicas y se mantuvieron en la incubadora a 27°C. Los ensayos se repitieron dos veces.

Se realizaron observaciones cada 24 h registrando el número de larvas muertas hasta las 72 h. Transcurrido cuatro días después de infectadas las larvas, se realizó disección del cuerpo entero (con una aguja y una espátula

¹Doctores Gabriela Lankin y Erwin Aballay, 2019. Comunicación personal.

entomológica) para verificar la presencia de adultos hermafroditas, indicativo de que la muerte fue producida por los nematodos entomopatógenos inoculados.

En los ensayos donde se utilizó el olfatómetro con cilindros de vidrio conteniendo las larvas de *G. mellonella*, se comprobó la movilidad de los JI de *H. amazonensis* cepa HC1, los cuales recorrieron 19,5 cm en 60 horas. En el periodo en que se evaluó (72 horas), la máxima mortalidad de las larvas de *G. mellonella* fue de 84,7 % y se constató que las larvas presentaron la coloración característica de la acción de esta cepa en los cadáveres (5) (Fig. 4). Según Andaló *et al.* (10),

la cepa de *H. amazonensis* que evaluaron se desplazó a distancias de 10 hasta 60 cm. En ensayos posteriores se introducirán tubos conectores de diferentes longitudes para determinar el desplazamiento horizontal de los JI. De igual modo, se deben realizar adecuaciones para determinar el desplazamiento vertical de los JI cuyos resultados poseen aplicación en estudios en condiciones de campo

El olfatómetro de dos cámaras, con la introducción de cilindro de vidrio y malla plástica, resultó útil para los estudios del efecto de factores abióticos sobre el comportamiento de los nematodos entomopatógenos en el

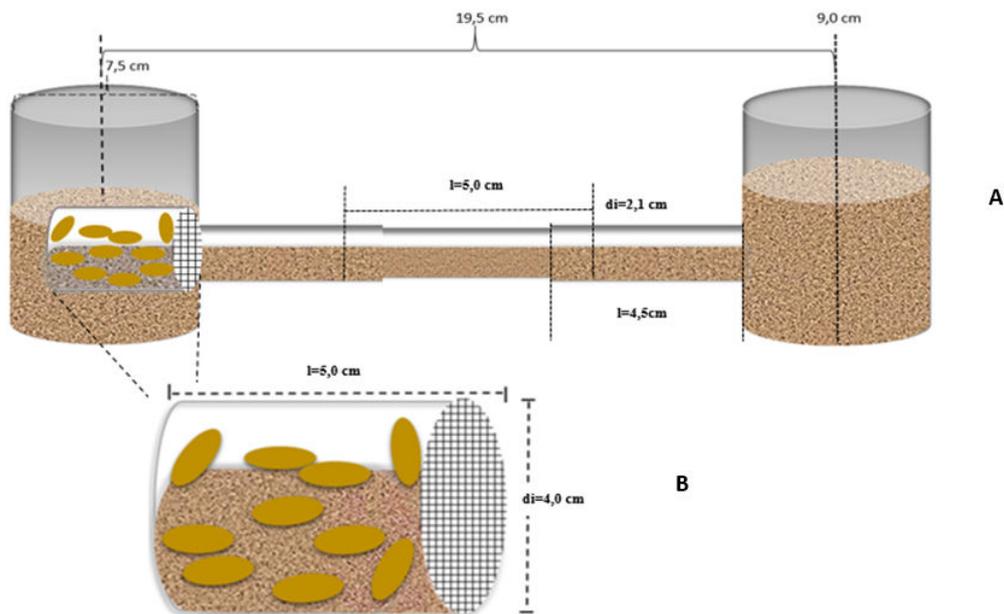


Figura 3. Esquema del olfatómetro de dos cámaras (A) y la columna de vidrio (B) rellenos con arena sílice útiles para evaluar la capacidad de búsqueda de cepas de nematodos entomopatógenos / Schematic drawing of the two-chambers olfactometer (A) and the glass column (B) filled with silica sand to evaluate search capacity of entomopathogenic nematodes.



Figura 4. Cadáveres de *G. mellonella* exhibiendo la coloración típica provocada en estos insectos por la infección de cepa HC1 de *H. amazonensis* / *G. mellonella* cadavers showing the typical color caused by infection of the strain HC1 of *H. amazonensis*

laboratorio. Los cilindros de vidrio con malla plástica evitan que las larvas de *G. mellonella*, que son muy móviles, se desplacen en el “brazo” que las contiene y que hagan contacto con los JI.

El uso de este tipo de equipo en el laboratorio permitirá estandarizar condiciones de los estudios en Cuba y la comparación de resultados entre los diferentes grupos de investigación. Su construcción resulta fácil y los recursos utilizados son accesibles en las condiciones de Cuba, pudiendo ser construidos en cada lugar para evaluar el comportamiento de la cepa y de otras cuando se estudian, por ejemplo, el efecto de factores abióticos sobre el comportamiento de los JI.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud a los Doctores Gabriela Lankin Vega y Erwin Aballay, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, por ofrecer el olfatómetro de seis brazos para trabajos de laboratorio. A la Ing. Dayris García Perera por su colaboración en la producción de nematodos y larvas de *Galleria mellonella*. Al personal de talleres Yohanner Fernández y David Martínez. A las Doctoras Carolina Rosales y Belkis Peteira por sus revisiones y sugerencias. Este ensayo se desarrolló en el marco del Proyecto “Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases” (MUSA, 727624; tópico: SFS-11-2016), financiado por la Unión Europea.

REFERENCIAS

1. Campos-Herrera R (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests - Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer. 2015:531 pp.
2. Ishibashi N, Kondo E. Behavior of infective juveniles. In: Gaugler R, Kaya HK (eds.). Entomopathogenic nematodes in Biological Control. 1990. CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor- Boston. pág. 139-153.
3. Kaya HK, Gaugler R. Entomopathogenic nematodes. Ann. Rev. Entomol. 1993; (38): 181-206
4. Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM, Hernández MA, Castellanos L, et al. 2001. Desarrollo de una metodología para la reproducción artificial de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en café. PNCT, Desarrollo Sostenible de la Montaña. CODIGO, 1850 0703023. Informe final Proyecto - CENSA. (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (<http://www.cenda.cult.cu>), Cuba, número 09613/1852 2002.
5. Rodríguez MG. Entomopathogenic nematodes in Cuba: from laboratories to popular biological control agents for pest management in a developing country. In: Campos-Herrera R (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests - Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer. 2015. pág. 343-364.
6. Boff MIC, Zoon FC, Smits PH. Orientation of Heterorhabditis megidis to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2001; 98: 329-337.
7. Rasmann S, Kollner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. Nature. 2005; 434:732-737.
8. Ali JG, Alborn HT, Stelinski LL. Subterranean Herbivore-induced Volatiles Released by Citrus roots upon feeding by Diaprepes abbreviatus recruit entomopathogenic nematodes. J Chem Ecol. 2010; 36: 361-368.
9. Enrique R, Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Valle Z. Dietas alternativas para la cría de *G. mellonella*. Influencia sobre el rendimiento-peso de larvas de *Galleria mellonella* y recobrado de juveniles infectivos. Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA). Número de Depósito CENDA2874-2006. Ciudad de la Habana, Cuba. 2006. 20 pág.
10. Andaló V, Santos V, Moreira C, Freire M, Moino A. Movement of Heterorhabditis amazonensis and Steinernema arenarium in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. Scientia Agricola. 2012; 69(3):226-230.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)