

Modificación a contenedor para la fase de incubación de *Galleria mellonella* L. en la reproducción *in vivo* de nematodos entomopatógenos



<https://cu-id.com/2247/v37n3e07>

Container modification for the incubation stage of *Galleria mellonella* L. for the *in vivo* reproduction of entomopathogenic nematodes

✉ Roberto Enrique Regalado*, Lidia López Perdomo, ✉ Mayra G. Rodríguez

Laboratorio de Nematología Agrícola. Departamento de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue evaluar la modificación de las tapas de los contenedores de polietileno transparente producidos en Cuba (tarrinas) para diversos usos, con el fin de poderlos utilizar en la fase de incubación de las larvas de *Galleria mellonella* L. en el proceso de producción *in vivo* de nematodos entomopatógenos, en el laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Para esto, se practicó un orificio de 7 mm de diámetro en el centro de las tapas, el cual se cubrió con malla plástica antiáfidos (apertura 300 µm), utilizando pegamento. Se valoraron los indicadores: Color de los cadáveres de *G. mellonella* a las 72 h de inoculación, presencia de insectos contaminantes y rendimientos en juveniles Infeccivos (JI). larva de *G. mellonella*⁻¹. Se pudo constatar que los cadáveres de *G. mellonella* presentaron el color marrón rojizo que produce la cepa HC1 de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* cuando la bacteria simbiote se encuentra en fase fenotípica I. No se produjeron contaminaciones por otros insectos y los rendimientos estuvieron entre 250 a 300 000 JI.larva de *G. mellonella*⁻¹. Los contenedores modificados se emplean con éxito en la producción de JI en el CENSA. Esta modificación, por su sencillez, puede ser extendida en el sistema de Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) del país.

Palabras clave: control biológico, *Heterorhabditis*, manejo de plagas, NEP.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the modification of the lids of the transparent polyethylene containers produced for diverse uses in Cuba (so called "tarrinas") to use them in the incubation stage of *Galleria mellonella* L. larvae in the *in vivo* reproduction of entomopathogenic nematodes in the Nematology Laboratory at the National Center for Plant and Animal Health (CENSA). For this, a central 7 mm hole was opened on the lids and covered an anti-aphid plastic net with 300 µm opening, using a glue. Indicators such as: color of the dead body of *G. mellonella* at 72 hours, presence of contaminating insects, and yield of infective juveniles (IJ).larvae of *G. mellonella*⁻¹ were determine. The dead bodies of *G. mellonella* showed a brown red color characteristically produced by the strain HC1 of *Heterorhabditis amazonensis* Andaló *et al.* when the symbiotic bacterium is in phenotypic phase I. No contaminations by others insects were observed, and the yields were between 250 to 300 000 IJ.larvae of *G. mellonella*⁻¹. The containers modified are being used in the production of IJ at CENSA. This modification, due to its simplicity, can be extended in the system of the Centers for the Reproduction of Entomophagous and Entomopathogens (CREE) in our country.

Key words: biological control, *Heterorhabditis*, pest management, EPN.

Los nematodos entomopatógenos (NEP) son agentes de control biológico de amplio uso en Cuba (1, 2) y su reproducción se hace *in vivo*, empleando como biorreactor larvas saludables (200 mg de masa) de último instar de *Galleria mellonella* L. a través de la metodología de Duckey *et al.* (3), con modificaciones introducidas por Sánchez *et al.* (4) y Enrique *et al.* (5).

Este método posee dos procesos principales, la producción de larvas de *G. mellonella* y la reproducción de la especie/cepa de nematodo. El segundo proceso, comprende la inoculación de las larvas con juveniles infectivo (JI) de la especie/cepa que se reproduce, la incubación de esas larvas inoculadas (para que se complete el ciclo del NEP dentro y se alcancen los

rendimientos en JI potenciales), la cosecha/limpieza y formulación de los JI (4).

En el marco del proyecto "Mejoramiento de la acción microbiana y su efecto sobre la resistencia de plantas para el manejo sostenible de plagas importantes de plátano y banano" (MUSA), desarrollado entre 2018 y 2022 por un consorcio de instituciones de diversos países, el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria tuvo dentro de sus objetivos de trabajo, el mejoramiento del proceso de producción *in vivo* de NEP utilizando *G. mellonella* y lograr la reproducción *in vitro* líquida de la cepa HC1 de *Heterorhabditis amazonensis* Anadló *et al.*

*Autor para correspondencia: Roberto Enrique Regalado. E-mail: r.enrique@censa.edu.cu

Recibido: 20/07/2022

Aceptado: 08/09/2022

En el caso del método de reproducción *in vivo* de NEP, la metodología desarrollada por Sánchez (6) sugirió el uso de contenedores de vidrio durante la fase de incubación, con el empleo de papel de filtro u otro sustituto que retuviera la humedad, lo que fue adoptado por los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) de Cuba, donde se produce esta especie/cepa. El uso de diferentes frascos, con la utilización de fragmentos de diferentes tejidos para evitar la entrada de insectos que pueden contaminar las larvas de *G. mellonella* y disminuir los rendimientos de JI (6), no siempre es efectivo, por lo que resulta necesario diseñar alguna modificación para lograr disminuir estas pérdidas.

Para la fase de incubación se tomaron los envases plásticos (tarrinas) con tapas de cierre hermético, que se producen en Cuba y forman parte de la dotación de insumos y materiales que poseen los CREE.

Se conoce que la producción *in vivo* de NEP es afectada por factores ambientales como son la temperatura, aireación y humedad relativa, impactando en los rendimientos de JI producidos (7, 8). Mantener una adecuada humedad es importante para que no se desequen los cadáveres (7), pero el exceso de agua es negativo para el proceso, por la limitación de oxígeno.

El empleo de los contenedores, tal como se reciben, no permite el intercambio gaseoso en las primeras horas del proceso, cuando las larvas están aún vivas, ni la transpiración que se produce en el proceso de incubación de las larvas de *G. mellonella* inoculadas con JI de NEP. Esto conlleva a la asfixia de las larvas antes de ser parasitadas y al exceso de humedad, con la aparición de abundante agua en las paredes del contenedor.

El objetivo de este estudio fue evaluar la modificación de las tapas de los contenedores de polietileno transparente, producidos en Cuba (tarrinas), de diversos usos, para emplearlos en la fase de incubación en el proceso de producción *in vivo* de nematodos entomopatógenos en el laboratorio de Nematología del CENSA.

Para esto, se practicó un orificio de 7 mm de diámetro en el centro de las tapas los cuales se cubrieron con malla plástica antiáfidos (apertura 300 μ m), empleando pegamento (Fig. 1). Se utilizaron dos franjas de papel ordinario (Bond), que tiene buena absorción, de 21,5 x 5 cm en las paredes y el fondo del contenedor y se colocaron 100 larvas por contenedor.

Las larvas de *G. mellonella* (200 mg de masa), producidas en el laboratorio utilizando las metodologías desarrolladas por Sánchez *et al.* (4) y Enrique *et al.* (5), se inocularon con 40 JI de *H. amazonensis* cepa HC1 por larva (6), cepa cuyo número de secuencia en GenBank es BankIt1899363 Hamaz_HC1 KU870321. Los contenedores se colocaron en cuarto oscuro a 27°C de temperatura durante 10-12 días. En estas condiciones se produjeron cuatro lotes, formados cada uno por 20 contenedores modificados.

Se valoraron los siguientes indicadores:

- i. Color de los cadáveres de *G. mellonella* a las 72 h de inoculación y se compararon con la escala desarrollada para ello (1).
- ii. Presencia de insectos contaminantes.
- iii. Rendimientos en JI.larva de *G. mellonella*⁻¹, realizando los conteos de JI siguiendo la metodología de Glazer y Lewis (9).

Se pudo constatar que los cadáveres (larvas) de *G. mellonella* presentaron el color marrón rojizo que produce la cepa HC1 de *H. amazonensis* cuando la bacteria simbiote se encuentra en fase fenotípica I, indicativo de la muerte causada por la cepa y que sugiere la reproducción del nematodo, de forma adecuada, dentro de la larva (1). (Fig. 2)

No se produjeron contaminaciones por la entrada, a los contenedores, de insectos como pequeñas moscas, que afectan las producciones en los CREE y que se presentaron, con frecuencia, en el Laboratorio de Nematología Agrícola del CENSA.

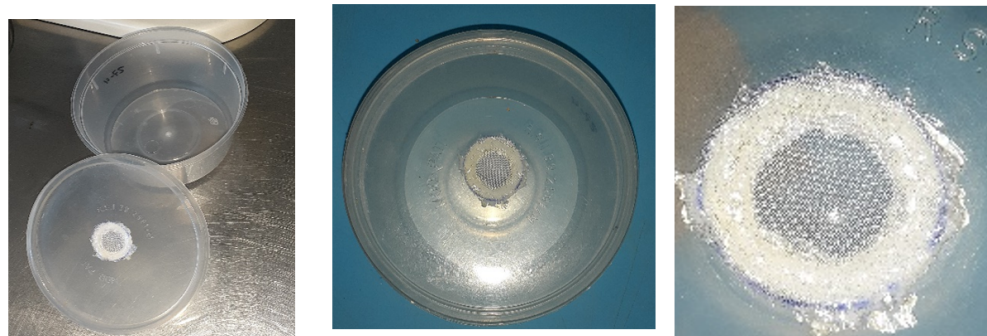


Figura 1. Adecuación realizada a la tapa del contenedor (tarrina) plástico, para evitar contaminaciones por insectos y permitir la transpiración durante el proceso de incubación de larvas de *G. mellonella* inoculadas con JI de NEP/ Adaptation made to the plastic container (tarrina) lid, to avoid contamination by insects and allow perspiration during incubation process of *G. mellonella* larvae inoculated with JI of EPN

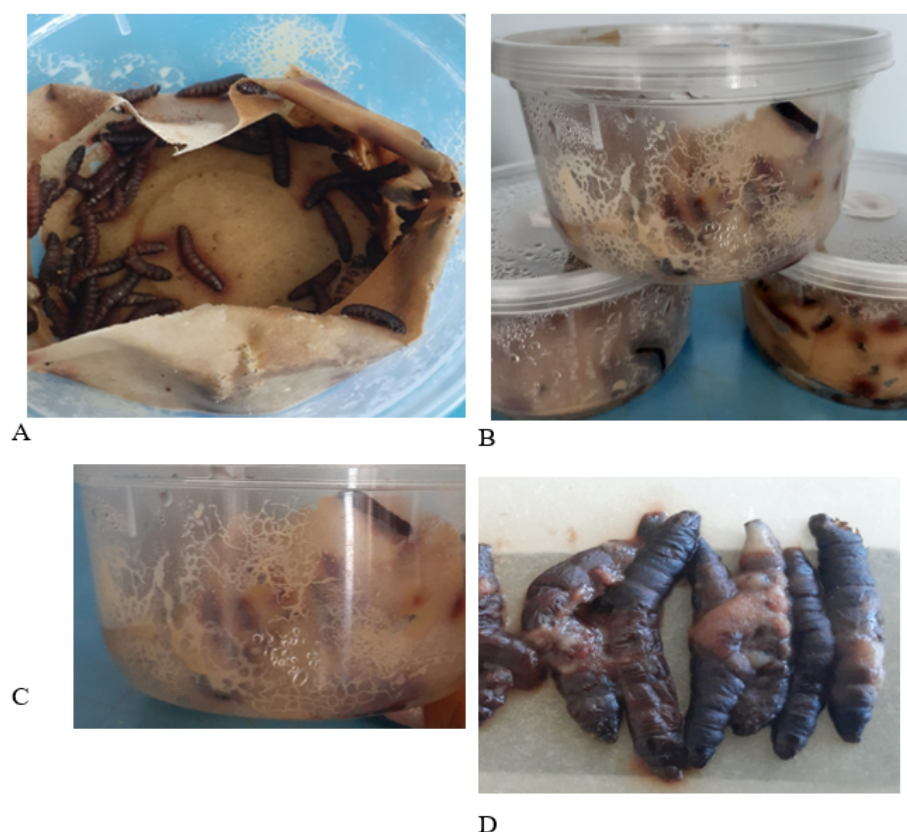


Figura 2. Contenedores (tarrinas) modificados con A) Larvas de *G. mellonella* exhibiendo la coloración provocada por la cepa HC1 de *H. amazonensis*. B-C) cordones conformados por JI de la cepa cuando comienzan a emerger de los cadáveres de *G. mellonella*. D) Trampa White con cadáveres de *G. mellonella* y JI emergiendo / Containers (tarrinas) modified with A) *G. mellonella* larvae exhibiting coloration caused by HC1 strain of *H. amazonensis*. B-C) cords formed by IJ of strain when they begin to emerge from *G. mellonella* dead bodies. D) White traps with dead bodies of *G. mellonella* and IJ emerging

Los contenedores con el orificio de ventilación en el centro y malla plástica, permitieron que se mantuvieran niveles de humedad (con gotas de agua en las paredes); sin embargo, no se produjo sobrehumedecimiento que afecta la disponibilidad de oxígeno de los JI. Se observa la presencia de “cordones” de JI en las paredes de los contenedores, como estructuras de panales de abeja, que se observan en los frascos de las producciones bidimensionales de NEP, cuando comienza la emergencia de los JI (8) y grandes cantidades de JI emergiendo de los cadáveres cuando se ubicaron los mismos en trampa White (10), modificada por Sánchez *et al.* (4). (Fig. 2)

Los rendimientos estuvieron entre 250-300 000 JI.larva de *G. mellonella* $^{-1}$; rendimiento potencial de esta cepa (6); así se constató que la modificación del contenedor no afecta los rendimientos de la cepa.

El uso de este contenedor modificado fue adoptado por el Laboratorio del CENSA y compartido con algunos CREE del país para su uso. Su construcción es fácil y los materiales están disponibles en el país, lo que facilitará su adopción, lo que se complementa con la sencillez de su modificación, experiencia que se puede extender en el sistema de CREE del país.

En otras partes del mundo, en la fase de incubación del proceso de reproducción *in vivo* se emplearon también frascos de vidrio reciclados con papel absorbente (11), placas Petri y bandejas, con papel de filtro u otros sustratos como suelo (12), así como contenedores y equipos con filtros HEPA (8). Esta es una etapa crucial del proceso para la obtención de rendimientos óptimos de JI, fase muy susceptible a las contaminaciones por insectos pequeños como moscas, que provocan el rechazo de lotes de producción, pues la descomposición de los cadáveres por el efecto de las larvas de esos contaminantes provoca la muerte de JI, la excreción al agua de las trampas White de soluciones fétidas de color marrón, que conllevan a operaciones auxiliares de limpieza y concentración de las soluciones de JI.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a los miembros del Laboratorio de Nematología Agrícola del CENSA: Ing. Dairys García Pereira MSc.; Ing. Daine Hernández Ochandía Dra. C. y Lic. Giselle Calabuche Gómez M. Sc. por su colaboración en el mantenimiento de las crías de *G. mellonella* y la reproducción de NEP. A la Ing. Moraima Tamayo,

directora del CREE del Municipio Melena del Sur, por facilitarnos los contenedores para los ensayos y su incorporación al proceso productivo del laboratorio. A la Dra. Belkis Peteira por el apoyo a las actividades del laboratorio en el marco del proyecto MUSA, la revisión de este trabajo y sus valiosas sugerencias. Los autores utilizaron tiempo y facilidades en el marco del Proyecto de la Unión Europea “*Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases*” (MUSA, 727624; topic: SFS- 11-2016), co-financiado por la Unión Europea y el Programa Sectorial de Salud Animal y Vegetal, del Ministerio de la Agricultura de Cuba.

REFERENCIAS

1. Rodríguez MG. Entomopathogenic nematodes in Cuba: From laboratories to popular biological control agents for pest management in a developing country. En Campos-Herrera R (Ed). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests-Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection; Springer: Cham, Switzerland; Heidelberg, Germany; New York, NY, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK, 2015; pp. 343-364.
2. Márquez ME, Vázquez LL, Rodríguez MG, Ayala JL, Fuentes F, Ramos M, *et al.* Biological control in Cuba. En van Lenteren J, Bueno VHP, Luna MG, Colmenarez YC (Eds). Biological control in Latin America and the Caribbean: Its rich history and bright future. CABI Invasives Series. 2020. Pp 176- 193. ISBN: 978 1789 2424 47.
3. Dutky SR, Thompson JV, Cantwell GE. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. Jour. Insect Pathol. 1964; 6:417-422.
4. Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM, Hernández MA, Castellanos L, *et al.* Desarrollo de una Metodología para la reproducción artificial de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en café. PNCT: Desarrollo Sostenible de la Montaña. Código: 0703023. Informe final proyecto- CENSA. 2001. (Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (CENDA), número de depósito CENDA 09613/ 2002). Cuba. 70 pp.
5. 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. 2006. (Documento depositado en Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA). Número de depósito CENDA 2874-2006). Cuba, 20 pp.
6. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. [Tesis en opción al grado de Dr. en Ciencias]. Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba. 2002. (Documento depositado en el Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA) Número 9613-2002). 100 pp.
7. Atwa AA. Entomopathogenic Nematodes as Biopesticides. En: K. Sahayaraj (Ed.). Basic and Applied Aspects of Biopesticides. Pp 69-98. Springer, India. 2014. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1877-7_5.
8. Saleh MM, Metwally HMS, Abonaem M. Commercialization of Biopesticides Based on Entomopathogenic Nematodes. En: N. El-Wakeil, Saleh M, Abu-hashim M. (eds.). Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications. Pp 253- 275. Springer Nature Switzerland AG. 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0_8.
9. Glazer I, Lewis EE. Bioassays for entomopathogenic nematodes. En A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes (pp. 229- 247). Wallingford, UK: CAB International. 2000.
10. White GF. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science, 1927; 66: 302-303
11. Rosales LC, Rodríguez MG, Enrique R, Puente L, García J. Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de insectos plagas. INIA Divulga (Venezuela). 2009; enero - abril: 19-22.
12. Askary TH, Ahmad MJ. Entomopathogenic nematodes: mass production, formulation and application. En Abd-Elgawad, TH Askary, J Coupland (Eds.). Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes. Pp 261- 286. CAB International. 2017.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Roberto Enrique: **Conceptualización, curación de datos, investigación, validación.** Lidia López: **Curación de datos, investigación, validación.** Mayra G. Rodríguez: **Supervisión, Escritura - borrador original, Redacción: revisión y edición.**

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/)