

USO DE *Zophobas morio* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EN REPRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Diego Munguía-Castellanos, Cristian Santiago-Reyes Silva, Luis Arturo Ibarra-Juárez e Isaac Zepeda-Jazo. Genómica Alimentaria, Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Avenida Universidad 3000, Fraccionamiento Lomas de la Universidad Sahuayo, Michoacán. México. CP 59103, z_isaac@hotmail.com.

RESUMEN: El uso de nematodos entomopatógenos (NEPs) como agentes de control biológico ya no es una novedad, existen gran variedad de productos plaguicidas formulados a base de estos microorganismos. Preexiste una costumbre generalizada del uso de larvas de *Galleria mellonella* L. (*Galleria*) para la extracción y reproducción de estos entomopatógenos en laboratorio. Esta metodología presenta inconvenientes como: corto tiempo de estadios larvarios de las *Galleria*, altos costos para su reproducción y condiciones de crecimiento muy específicas. En este trabajo, proponemos el uso de larvas de *Zophobas morio* F. (*Zophobas*) como insecto modelo para la cría de NEPs. La crianza de *Galleria* y *Zophobas* en dietas de bajo costo, demostró una mayor facilidad de crianza de las *Zophobas*, una mejor manipulación, así como en estudios de parasitismo sobre las *Zophobas* una alta susceptibilidad a los NEPs; lo que sugiere una alta viabilidad para su uso en estudios de NEPs.

Palabras clave: Control Biológico, *Galleria mellonella*, dietas, parasitismo.

Use of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) in entomopathogenic nematodes reproduction and extraction

ABSTRACT: Use of Entomopathogenic nematodes (NEPs) as biological control is not a novelty because there are a wide variety of commercial formulations for pest control based on these microorganisms. For the extraction and reproduction of these entomopathogenic microorganisms in low scale prevails a general custom of the use of *Galleria mellonella* (L.) larvae as insect model or bait. Nevertheless the methodology using wax moth larvae have some troubles as: short time of period of *Galleria* larvae, high costs to its reproductions and very specific raising conditions. In the current job, it is proposed the use of *Zophobas morio* F. (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae as a model insect to NEPs mass rearing. During the mass rearing of *Galleria* and *Zophobas* in low cost diet, we found greater facility and better manipulation of *Zophobas*, besides in parasitism studies about *Zophobas* there is a high susceptibility to NEPs, in front of which suggest a good viability for their use in NEPs studies.

Key words: Biological Control, *Galleria mellonella*, diets, parasitism

Introducción

El uso de nematodos entomopatógenos (NEPs) para control de insectos se ha vuelto una alternativa viable para el manejo integrado de algunas plagas agrícolas. Entre sus características se encuentran su capacidad de buscar hospederos, la rapidez en la inhabilitación del insecto parasitado (24 a 48 hrs) y su amplia distribución en los diferentes agro ecosistemas a nivel mundial. Sin embargo, su uso comercial se ha visto limitado por la falta de aislados nativos adaptados a cada agro ecosistema de interés; es decir, los productos comerciales (90 empresas) se basan en el uso de especies aisladas de regiones diferentes a donde son utilizados (Realpe-Aranda, Bustillo-Pardey y López-Núñez, 2007). Es en este sentido que se siguen haciendo estudios de presencia de nematodos entomopatógenos en diferentes regiones del planeta, con el fin de contar con aislados nativos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de cada región, así como identificar nuevas especies y seguir probando las ya conocidas sobre diferentes plagas de interés agrícola y sus formulaciones (Georgis y Kaya, 1998). Para este fin se han usado larvas de *Galleria mellonella* L. (*Galleria*) como carnada o cebo, así como para la

reproducción masiva de los mismos (Mwaniki *et al.*, 2013). Existen reportes de una gran variedad de especies de insectos que son susceptibles al parasitismo de nematodos; entre estas se han reportado como muy sensibles y de fácil crianza a larvas de *Galleria mellonella* (Realpe-Aranda, Bustillo-Pardey y López-Núñez, 2007), *Bombyx mori* (Mwaniki *et al.*, 2013), *Spodoptera frugiperda* (Salvadori *et al.*, 2012) y otros lepidópteros, así como coleópteros como *Tenebrio molitor* (Christen *et al.*, 2007) y *Zophobas morio* (Hallem *et al.*, 2011). Aun así se sigue usando a las larvas de la palomilla mayor de la cera (*Galleria mellonella*) como único insectos trampa o cebo (Lortkipanidze, Chkhubianishvili y Burjanadze, 2010). Así mismo, se usan diferentes métodos de crianza de estas larvas para diferentes usos, todos implican cierto grado de dificultad, gasto de tiempo y dinero, incluso en las más sencillas (Birah *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2012; Rocha-Costa, Pedroso-Días y Frota-Morenz, 2007), lo que ha provocado que la cría de estos lepidópteros con fines de investigación en la reproducción de NEPs se haya reducido y se opte por comprar a empresas especializadas haciendo dependiente de estos el trabajo de los científicos. Existen muchos reportes de parasitismo de NEPs sobre diferentes órdenes de insectos en donde predominan los estadios larvarios de lepidópteros y coleópteros. Entre las larvas de insectos de fácil manejo y reproducción para su uso como dieta de diferentes organismos (Shulte, 1996) se encuentran las *Zophobas morio* F. (*Zophobas*) que a su vez se ha reportado son susceptibles al ataque por NEPs (Hallem *et al.*, 2011). Por lo anterior el objetivo del presente estudio es evaluar la factibilidad del uso de *Zophobas morio* para la cría y extracción de nematodos entomopatógenos.

Materiales y Método

Método de cría de *Zophobas*. El pie de cría de las larvas de *Zophobas morio* F. (Coleoptera: Tenebrionidae) se adquirió en una tienda de mascotas especializada. Para la crianza de *Zophobas* se utilizó medio de cultivo preparado con avena integral y sémola de trigo marca 1 minuto. Se utilizaron recipientes redondos de plástico de capacidad de 1 litro en donde se agregó 220 g de la mezcla mencionada anteriormente y se colocaron 10 *Zophobas* adultos, una vez que se observaron larvas de 1er. instar en el interior de los recipientes, los adultos fueron retirados. Las larvas fueron cultivadas en el medio antes mencionado al cual se agregó 1 trozo de manzana (20 g) 2 veces por semana durante 3 meses; una vez que el medio se tornaba en una apariencia arenosa (aproximadamente cada 15 días), este se cambiaba por medio nuevo, una vez transcurrido ese tiempo las larvas fueron colocadas en un recipiente acondicionado con espacios individuales (caja transparente con secciones marca Impact) para promover que puparan. Cuando los adultos emergieron de las pupas separadas, se repitió el procedimiento mencionado. Se utilizaron larvas del último instar para todos los experimentos.

Método de cría de *Galleria*. El pie de cría de larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) fueron provista por un apicultor de la comunidad de San Pedro del municipio de Venustiano Carranza, Michoacán. La técnicas de crianza de larvas de *Galleria* se basó en una dieta modificada (Ellis *et al.*, 2013; Realpe-Aranda, Bustillo-Pardey y López-Núñez, 2007). La elaboración de la dieta se realizó mezclando por separado los sólidos y los líquidos. Se pesaron por separado todos los sólidos: Cereal Gerber® 4 cereales (300 g), polen de abeja (25gr) y vitamina en polvo Vita-Fiori (0.75 g) en un recipiente de plástico y se mezclaron con ayuda de una espátula hasta formar una mezcla más o menos homogénea. Posteriormente se midieron los líquidos miel de abeja (75ml), glicerina (75 ml) y agua destilada (75 ml), se colocaron en un vaso de precipitados y se calentaron a una temperatura de 80 °C por acción de la plancha con agitación por mosca, con el fin de que estos líquidos perdieran su consistencia espesa y formaran una mezcla homogénea.

Las mezclas tanto solidas como líquidas se unieron y revolviaron con una espátula hasta que se formó una pasta, con las características de porosidad y humedad esenciales para la crianza y desarrollo

de larvas de *Galleria mellonella*. Una vez emergidos los adultos se pasan a cámaras (recipientes de plástico) para su oviposición, posteriormente los huevecillos son transferidos a dieta nueva para su emergencia.

Extracción de NEPs. Se tomaron 5 muestras de suelo aproximadamente 1kg en el campus de la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo en Sahuayo, Michoacán (suelo no cultivado), las muestras fueron pasadas por un tamiz de tamaño de malla 8 para obtener una muestra tamizada de 400 gr. Se agregaron 5 larvas de *Zophobas morio* a cada muestra con dos repeticiones. Se revisaron las muestras diariamente a partir del 5to día para extraer las larvas muertas y se transfirieron a trampas de White (Glazer y Lewis, 2000; Kaya y Stock, 1997) modificadas (cajas Petri de 5 cm con papel filtro en la base humedecido con 2 ml de agua destilada estéril e inclinadas 20°). Se comprobaron las muestras positivas. Una vez emergidos los juveniles en las larvas parasitadas se procedió a realizar una re inoculación sobre larvas de *Zophobas* para confirmar los postulados de Koch.

Re inoculación sobre larvas de *Zophobas*. Se elaboraron 10 arenas de inoculación con cajas Petri de 5 cm de diámetro, cada una con un trozo de papel filtro en la base de la caja. En seguida se tomaron 10 larvas de *Zophobas* (último estadio) de un peso aproximado de 0.37 g por larva, colocando cada una en su respectiva caja Petri, y se agregó 1 ml de agua destilada con 800 NEPs (recuperados de las larvas de cebado) aproximadamente a cada caja (Glazer y Lewis, 2000). Una vez que las larvas murieron o presentaban evidencias de infección (Lezama-Gutierrez, Hueso-Guerrero y Moran-Rodriguez, 2009) se pasaron a trampas de White (Glazer y Lewis, 2000; Kaya y Stock, 1997) modificadas (cajas Petri de 5 cm con papel filtro en la base humedecido con 2 ml de agua destilada estéril e inclinadas 20°). Después de 40 horas se procedió hacer la disección de las larvas para detectar la presencia de NEPs.

Resultados y Discusión

Desde el desarrollo y reproducción de *Zophobas morio*, el proceso fue notablemente más sencillo y económico que el de *Galleria*. El costo de un kilogramo de dieta constituido por cereal gerber (4 cereales), miel, glicerina, polen de abeja, vitaminas (Vita-Fiori) y agua es de aproximadamente \$ 69.00 y el de *Zophobas* constituido por avena integral y sémola de trigo es de \$ 20.00. Lo que representa un ~70% menos del costo de la dieta para las *Zophobas*. Además, se observó que el método de crianza requiere menos cuidados que los utilizados tradicionalmente para las *Galleria* (Birah y col., 2008), ya que para las *Zophobas* no es necesario un control estricto de temperatura y humedad (Fig. 1), lo que en las *Galleria* es indispensable para evitar la contaminación y los cambios tempranos de estadio.

Además el periodo larval más largo de las *Zophobas* ~84 días (Shulte, 1996), permite tener por más tiempo larvas disponibles para su uso lo que comparado con las *Gallerias* 48.5 días a 25°C (Realpe-Aranda, Bustillo-Pardey y López-Nuñez, 2007) no limita su disponibilidad para estudios constantes o interrumpidos con NEPs.

En los estudios de extracción de NEPs con el uso de *Zophobas* solo tres larvas de una muestra (y una en la repetición de la misma muestra) de las 5 evaluadas en las dos repeticiones mostraron parasitismo por NEPs lo que corresponde a un 20 % de muestras positivas, lo que es común en estudios en México de presencia de NEPs en suelos no cultivados (Zepeda-Jazo *et al.*, 2014). La factibilidad del uso de *Zophobas* para el aislamiento de NEPs tendría que confirmarse con estudios de susceptibilidad a las diferentes especies de NEPs de interés agrícola, ya que estas exhiben diferente capacidad parasitaria

dependiente del tipo de hospedero (Glazer y Lewis, 2000) además de repetir el experimento con más muestras de suelo.



Figura 1. Cría de *Zophobas morio*: a) Dieta y larvas de *Zophoba*, b) Aislamiento de larvas para cambio de estadio a adulto, c) Adulto de *Zophobas morio*.

La re inoculación de larvas de *Zophobas* si fue altamente positiva con un 100% de mortalidad de las larvas. El experimento mostró características interesantes como fue la obtención de un gran número de nematodos entomopatógenos activos y muy móviles. Además mostro otras características positivas como lo fue en el manejo más fácil de las larvas por su mayor tamaño, repercutiendo en la velocidad de su manipulación. Sin embargo, aún falta evaluar la reproducción de NEPs (No. de NEPs) sobre estas larvas comparado con lo reportado en las larvas de *Gallería*, 200,000 a 400,000 juveniles infectivos (Flanders, 1996; Kaya, 1993) además de evaluar la factibilidad de su uso para determinar el género de los NEPs por su coloración.

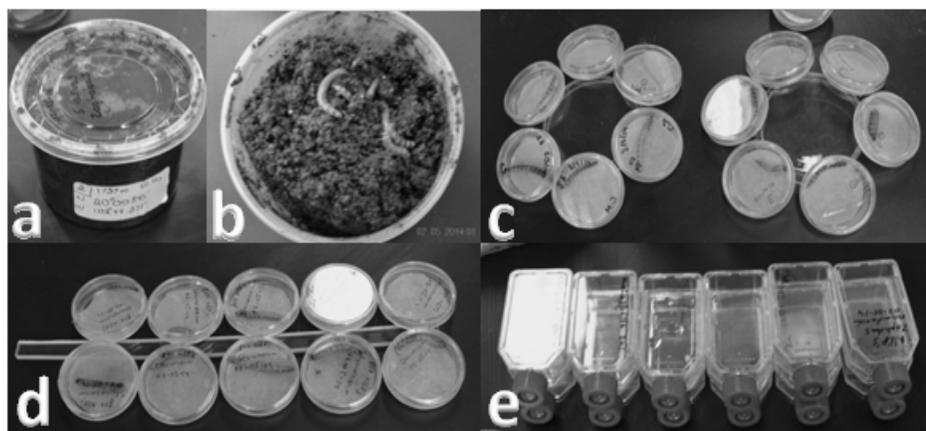


Figura 2. Extracción de NEPs y pruebas de patogénesis: a) Muestras de suelo para cebado, b) Larvas de *Zophobas* en muestras de suelo, c) Trampas de White modificas, d) Re inoculación de larvas de *Zophobas*, e) Nematodos aislados.

Conclusiones

Debido a los bajos costos de reproducción y su fácil manejo las larvas de este coleóptero puede ser una nueva alternativa para la multiplicación *in vivo* de NEPs así como para llevar a cabo ensayos de extracción en suelos con la técnica de cebado. Nuestros resultados dan las bases para futuros estudios de susceptibilidad de *Zophobas morio* a diferentes especies de NEPs.

Agradecimientos

Proyecto PROMEP/103.5/13/6816

Literatura Citada

- Birah, A., Chilana, P., Shukla, U. K. y G. P. Gupta. 2008. Mass rearing of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) on artificial diet. *Indian Journal of Entomology*. 70: 389-392.
- Christen, J. M., Campbell, J. F., Lewis, E. E., Shapiro-Ilan, D. I. y S. B. Ramaswamy. 2007. Responses of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Parasitology*, 134: 889-898.
- De Marco-Salvadori, J., Schumacher-Defferrari, M., Ligabue-Braun, R., Yamazaki-Lau, E., Salvadori, J. R. y C. R. Carlini. 2012. Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control*, 63: 253-263.
- Ellis, J. D., Graham, J. R. y A. Mortensen. 2013. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*, 52: 2-18.
- Flanders, K. L., Miller, J. M. y E. J. Shields. 1996. In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *J. Econ. Entomol.* 89: 373-380.
- Georgis, R. y H. K. Kaya. 1998. Formulation of Entomopathogenic Nematodes. En: Burges, H. D. Formulation of Microbial Biopesticides. Springer Science + Business Media, B. V. pp. 289-308.
- Glazer, I. y E. E. Lewis. 2000. Bioassays of Entomopathogenic Nematodes En: Navon, A. y Ascher K.R.S. (Ed.) Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, pp. 229-247.
- Hallem, E. A., Dillman, A. R., Hong, A. V., Zhang, Y., Yano, J. M., DeMarco, S. F. y P. W. Sternberg. 2011. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Curr. Biol.*, 21: 377-383.
- Kaya, H. 1993. Contemporary issues in biological control with entomopathogenic nematodes. Food and Fertilizer Technology Center. Taipei, Republic of China on Taiwan. Extension Bulletin, N° 375. 13 p.
- Kaya, H. K. y S. P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. En: Lacey, L. (Ed.) Manual of techniques in insect Pathology. Academic Press, San Diego, pp. 281-324.
- Lezama-Gutiérrez, R., Hueso-Guerrero, E. J. y C. Moran-Rodríguez. 2009. Nematodos Entomopatógenos. En: Lezama-Gutiérrez R. y García-Gutiérrez C. Manual de Técnicas para el Aislamiento, Identificación y Caracterización de Hongos y Nematodos Entomopatógenos. Instituto Politécnico Nacional, pp. 83-117.
- Lortkipanidze, M., Chkhubianishvili, T. y M. Burjanadze. 2010. Isolation of Entomopathogenic Nematodes from the Soil. *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.*, 4: 137-140.

- Metwally, H. M. S., Hafez, G. A., Hussein, M. A., Hussein, M. A., Salem, H. A. y M. M. E. Saleh. 2012. Low Cost Artificial Diet for Rearing the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a Host for Entomopathogenic Nematodes. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 22: 15
- Mwaniki, S.W., Nderitu J. H., Olubayo, F. y J. W. Kimenju. 2013. Mass Production of Entomopathogenic Nematodes Using Silkworm (*Bombyx mori* L.) For Management Of Key Agricultural Pests. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11295/35517>
- Rocha-Costa, J. C., Pedroso-Días, R. J. y M. J. Frota-Morenz. 2007. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis riobravirus* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Parasitology Research, 102: 139-144.
- Shulte, R. 1996. El manejo de *Zophobas morio* (coleoptera: tenebrionidae) en climas tropicales húmedos. Folia Amazónica, 8: 47-75.
- Zepeda-Jazo, I., Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutierrez, R., Skoda, S. R. y J. E. Foster. 2014. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Colima, México. International Journal of Tropical Insect Science, 34: 53–57.