

MODIFICACIONES DEL MÉTODO DE CRÍA DE *Diatraea magnifactella* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Jorge Cuevas-Molina¹, Adriana Gabriela Trejo-Loyo^{2*}, Alicia Fonseca-González³, Laura Patricia Lina-García^{3*}, Víctor Manuel Hernández-Velázquez^{3*} y Verónica Obregón-Barboza^{3*}.

¹Facultad de Ciencias Biológicas.

²Centro de Investigaciones Biológicas.

³Centro de Investigación en Biotecnología. *Cuerpo Académico de Entomología y Fitopatología. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. CP 62209.

✉Correo: verónica.obregon@uaem.mx.

RESUMEN: Se evaluaron diferentes recipientes para el desarrollo larval de *Diatraea magnifactella* en condiciones de laboratorio. Dado que el agar-agar y la sacarosa son dos de los ingredientes más costosos en la preparación de dietas merídicas utilizadas para el mantenimiento de colonias de insectos, se realizó la sustitución de sacarosa grado reactivo por azúcar refinada en la dieta merídica. Adicionalmente, se evaluaron varios agentes gelificantes como alternativa a la utilización de agar-agar. No hubo diferencias significativas entre los recipientes probados, pero difirieron del control. No hubo diferencias significativas en la talla y peso de las pupas obtenidas de larvas alimentadas con azúcar refinada, pero sí entre el tratamiento de 40g de sacarosa y el control en el peso de las pupas, siendo mayor en las del tratamiento. No se logró la sustitución total de agar-agar, sin embargo la combinación de pectina/agar-agar presentó un buen desempeño durante la evaluación de la vida de anaquel.

Palabras clave: *Diatraea magnifactella*, cría, dieta merídica.

Modification of the mass rearing method for *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera : Crambidae) under laboratory conditions.

ABSTRACT: We evaluated different containers for larval development of *Diatraea magnifactella* under laboratory conditions. Since the agar-agar and saccharose are two of the most expensive ingredients in the preparation of meridic diets used for maintaining insect colonies, we used refined sugar instead of reagent grade saccharose in the meridic diet. Additionally, some gelling agents as an alternative to the use of agar were evaluated. There were no significant differences between containers, but they were different from the control. There were no significant differences in the size and weight of pupae obtained from larvae fed with refined sugar, but differences between the treatment of 40g of saccharose and the control were showed in the weight of pupae, with the highest value in the pupae from the treatment. The total replacement of agar -agar was not achieved, however the combination of pectin / agar -agar had good performance during the evaluation of shelf life.

Key words: *Diatraea magnifactella*, mass rearing, meridic diet.

INTRODUCCIÓN

El barrenador de los tallos *Diatraea magnifactella* Dyar, es una de las principales plagas de lepidópteros que afecta el cultivo de la caña de azúcar. Este insecto está ampliamente distribuido en las zonas cañeras de México, incluyendo el estado de Morelos (Rodríguez-del-Bosque y Vejar-Cota, 2008). La larva se alimenta de los tallos, generando pérdidas en los rendimientos del cultivo y favoreciendo la entrada de patógenos (Romero-Corrales, 1981). El control químico de este insecto no ha sido efectivo debido a que la mayor parte de su ciclo de

vida se mantiene dentro del tallo de la caña. Por otro lado, el uso indiscriminado de insecticidas químicos ha generado diversos problemas tales como resistencia en los insectos, daños al hombre y al ambiente, entre otros, lo que ha fomentado la constante búsqueda de alternativas para su control (Hernández-Chicas, 2011).

Uno de los objetivos del laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (UAEM) es la búsqueda de nuevos agentes microbianos para el control de plagas de importancia agrícola; en la actualidad se buscan entomopatógenos de *D. magnifactella*. El aislamiento y selección de los microorganismos se lleva a cabo realizando bioensayos para determinar su actividad en insectos plaga. Sin embargo, para realizar estas evaluaciones es necesario contar con crías insectiles bien establecidas que permitan el mantenimiento de individuos sanos y en cantidades suficientes (Vejar-Cota, 1994), ya que no es recomendable utilizar insectos colectados recientemente de campo que podrían estar infectados con entomopatógenos (Gupta *et al.*, 2005).

Dentro de los múltiples requerimientos que necesitan las crías de insectos, una de las más importantes es la dieta. La calidad y excelente nutrición de los insectos depende principalmente de ésta. No obstante, su elaboración puede resultar costosa debido a ingredientes como el agar-agar y la sacarosa (Abbasi *et al.*, 2007). Aunado a esto, las larvas de *D. magnifactella* son caníbales y es necesario mantenerlas individualmente en cajas Petri de 60mm de diámetro, realizando cambios de dieta cada 8 días durante todo el estado larval; este procedimiento incrementa aún más los costos de producción. Por lo anteriormente descrito, el objetivo del presente trabajo fue evaluar opciones para el mantenimiento de la cría de *D. magnifactella*, mediante la selección de recipientes que permitan su desarrollo desde el estado larval hasta el de pupa, evitando los constantes cambios de dieta y de recipiente, así como también evaluar agentes gelificantes más económicos y la sustitución de la sacarosa por azúcar refinada.

MATERIALES Y MÉTODO

Las larvas fueron obtenidas a partir de un pie de cría establecido en el laboratorio, las cuales fueron alimentadas con dieta merídica y se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de $80 \pm 10\%$ y un fotoperiodo de 12:12 L:O.

En el experimento uno se utilizaron recipientes de polipropileno con tapa de rosca de 40mm de diámetro y 30mm de alto. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos en los cuales se realizaron modificaciones en los recipientes para permitir la aireación. En el tratamiento 1 (T1), se realizaron cuatro orificios de 2mm de diámetro en la parte superior de los recipientes (Figura 1). En el tratamiento 2 (T2), el recipiente se cerró parcialmente. En el tratamiento 3 (T3), el recipiente se cubrió con una toalla de papel estéril y luego se cerró. Y finalmente, en el tratamiento 4 (T4), se hizo un orificio de 10mm de diámetro en la tapa del recipiente, que fue cubierto con una malla antiáfidos. El control consistió de una caja Petri de 60mm de diámetro (Figura 1).

En cada recipiente se vertieron 20ml de dieta merídica. Una vez solidificada, se colocó una larva de tercer instar por recipiente y se mantuvieron bajo las condiciones antes mencionadas. Los recipientes fueron monitoreados periódicamente hasta la colecta de las pupas. Tres días posteriores a la colecta, las pupas se midieron con un vernier electrónico y se pesaron en una balanza analítica para registrar los datos. Adicionalmente, se determinó el sexo de las pupas utilizando un microscopio estereoscópico de acuerdo al protocolo descrito por Rincón y López-Ávila (2004).

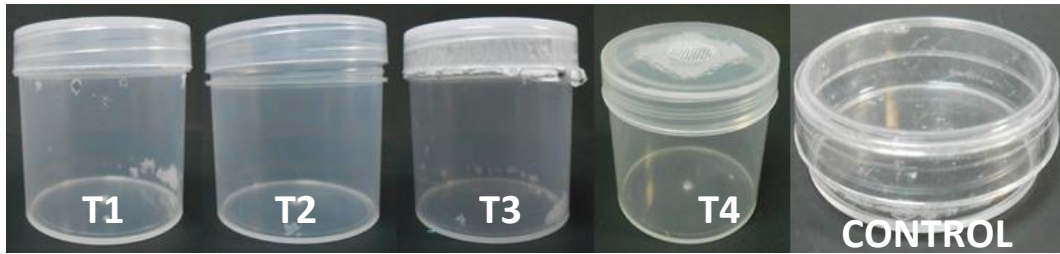


Figura 1. Recipientes utilizados para el desarrollo larval de *D. magnifactella*.

Con base a los resultados obtenidos en el experimento uno, se seleccionó el recipiente más adecuado que fue utilizado en los siguientes experimentos. En el experimento dos, se realizaron tres tratamientos para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa grado reactivo incluida en la dieta merídica, sobre la talla y el peso de las pupas: 20g (T1), 40g (T2) y 80g (T3); el control consistió de dieta con 13g de sacarosa. Se vertieron 20mL de dieta por recipiente y una vez solidificada, se depositó una larva. Se colectaron las pupas de cada tratamiento para medirse y pesarse. Igualmente se registró el sexo de los individuos.

El tercer experimento, se realizó igual que el anterior a excepción de que los tratamientos consistieron de dieta merídica con 20 (T1), 40 (T2) y 80g (T3) de azúcar refinada; en este experimento el control fue dieta merídica con 13g de azúcar. Se colectaron las pupas de cada tratamiento, se midieron y pesaron y se registró el sexo de cada organismo.

La finalidad del último experimento fue únicamente evaluar la vida de anaquel de dieta merídica preparada con otros agentes gelificantes diferentes al agar-agar y en combinación con éste (Cuadro 1). La unidad experimental consistió de un recipiente con 20mL de dieta, que una vez gelificada fue mantenida en las condiciones de insectario antes mencionadas. Se evaluaron durante 30 días revisando si mantenían o no las características de una dieta preparada con agar-agar.

Cuadro 1. Cantidades de agentes gelificantes utilizados para 100ml de dieta merídica.

Tratamientos con agentes gelificantes para preparar 100ml de dieta merídica
Grenetina (2g)
Grenetina (1g) agar (0.75g)
Pectina (1g)
Pectina (0.5g) agar (0.75g)
Tapioca (6g)
Tapioca (3g) agar (0.75g)
Grenetina (4g)
Grenetina (1.5g) agar (0.75g)
Pectina (2g)
Pectina (0.75g) agar (0.75g)
Tapioca (9g)
Tapioca (4.5g) agar (0.75g)

Para todos los bioensayos se realizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizaron tres replicas por cada experimento, utilizando 20 unidades experimentales. Se utilizó el programa SAS/STAT para realizar el análisis de varianza. Y después se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 0.05%. Los datos que no

presentaban homogeneidad de varianza a pesar de la transformación de datos se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el programa InfoStatS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los tratamientos de los recipientes evaluados fueron estadísticamente iguales, difiriendo del control que presentó el valor más bajo de longitud y peso de las pupas (Figura 2 y 3). Esta diferencia entre los tratamientos y el control puede explicarse por la constante manipulación de las larvas y el continuo cambio de dieta debido a que las cajas Petri no admiten la misma cantidad ya que su capacidad es menor. Aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, se observó que los recipientes del tratamiento 1 fueron más adecuados para la conservación de la dieta, ya que mantenían una buena humedad y no había contaminación por hongos o bacterias. La pérdida de agua en la dieta podría ocasionar que a la larga las larvas entraran en diáspausa, ya que requieren agua para sus funciones metabólicas (Peairs y Saunders, 1980).

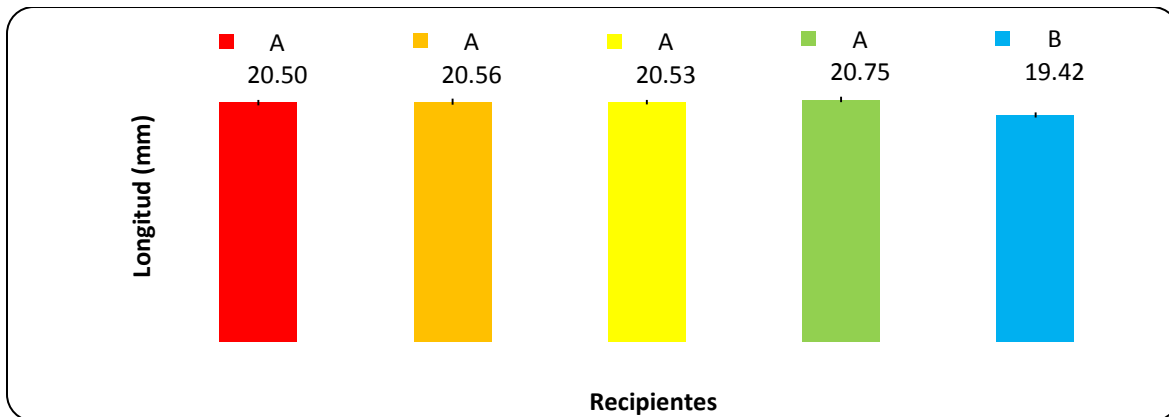


Figura 2. Longitud promedio de pupas de *D. magnifactella* en diferentes tipos de recipientes. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes. Tukey con un $\alpha= 0.05\%$.

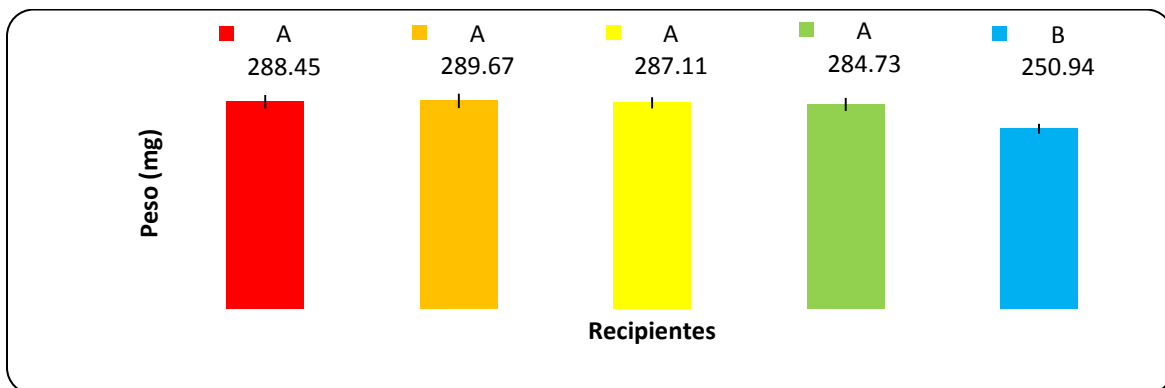


Figura 3. Peso promedio de pupas de *D. magnifactella* en diferentes tipos de recipientes. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes. Tukey con un $\alpha= 0.05\%$.

Con relación al experimento de sacarosa, el mejor tratamiento fue con 40g ya que las pupas mostraron los valores más altos en longitud y peso. No obstante, fue estadísticamente igual en ambos parámetros con el tratamiento de 20g. En la longitud de pupas difirió estadísticamente del de 80g pero fue igual al control, en tanto que en peso fue diferente al control pero igual al de

80g (Figura 4a y b). Los carbohidratos son importantes para el estado larval de los insectos ya que les ayudan con algunas funciones metabólicas y en los últimos instares sirven como materia prima para el almacenamiento de energía formando lípidos. Al estar en bajas concentraciones en la dieta, los insectos pueden disminuir su talla (Ojeda-Ávila *et al.*, 2003). Las altas concentraciones de sacarosa también pueden resultar negativas pues a las larvas neonatas puede no agradales el sabor de la dieta y optar por alimentarse menos. Esto se ve reflejado en una talla y peso menor. Esto puede deberse a que las larvas neonatas al principio no se alimentan del tallo de la caña sino de la hoja que contiene menos sacarosa, este hábito hace que las larvas no consuman de igual forma la dieta y por lo tanto su talla y peso sean menores (Linares y Salazar, 2007). En los tratamientos con azúcar refinada no hubo ninguna diferencia en el peso y longitud entre los tratamientos y el control (Figuras 5a y b).

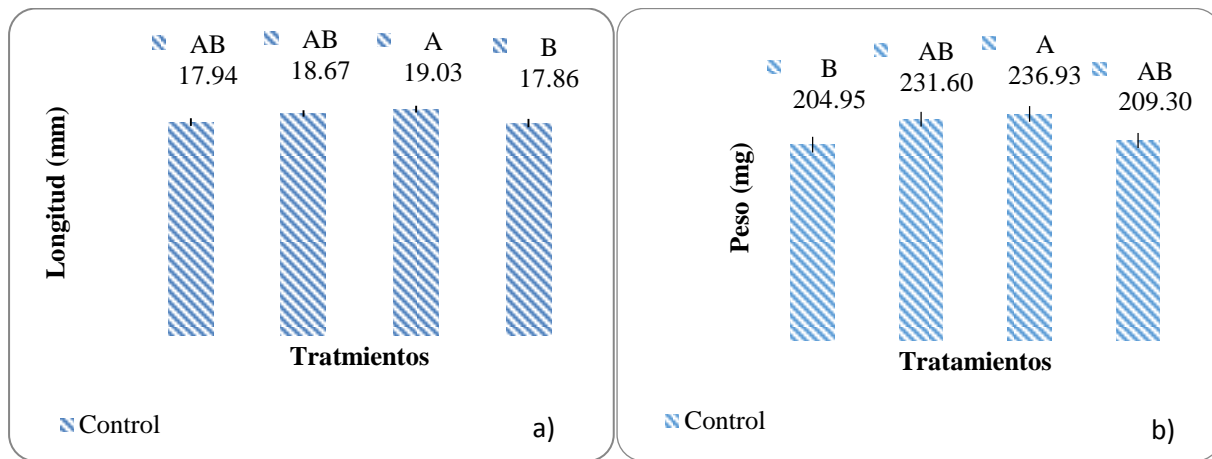


Figura 4. Medidas promedio de pupas de *D. magnifactella* a diferentes concentraciones de sacarosa: a) Longitud b) Peso. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes. $\alpha=0.05\%$.

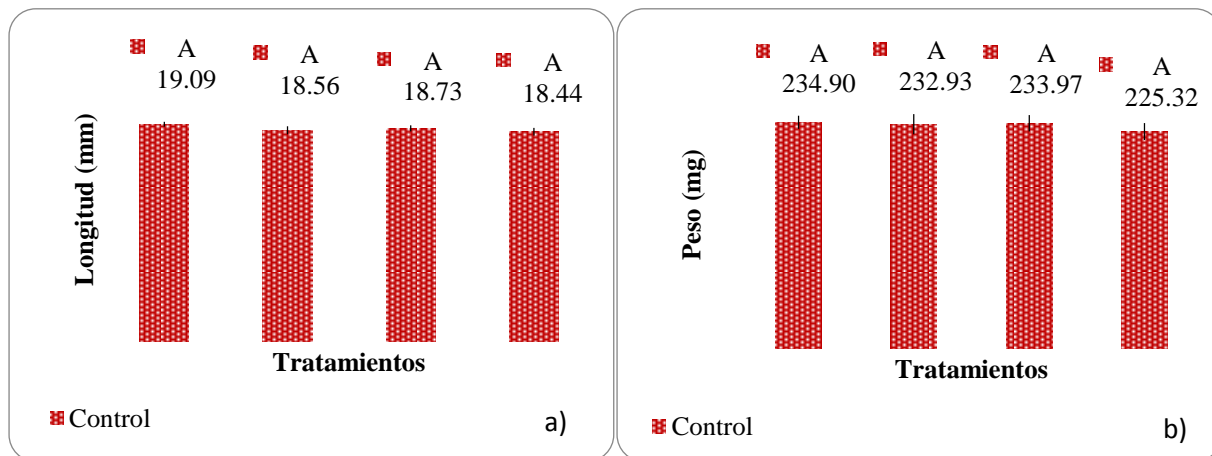


Figura 5. Medidas promedio de pupas de *D. magnifactella* a diferentes concentraciones de azúcar: a) Longitud b) Peso. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes. $\alpha=0.05\%$.

Finalmente en el experimento de gelificación, los tratamientos que mejor desempeño mostraron durante los 30 días en condiciones de laboratorio fueron el de 0.5g de pectina con 0.75g de agar y el de 0.75g de pectina con 0.75g de agar, ya que en ellos la consistencia fue firme y no se deshidrataron. La gretina a pesar de ser un gelificante comúnmente usado en la

industria alimentaria, fue la que peor resultados tuvo. A pesar de haber seguido las instrucciones del fabricante, incrementar al doble la cantidad y mezclarla con agar, no permitió tener una dieta estable. Eso difiere mucho de lo que reporta Zamora (2014) al utilizar una dieta a base de grenetina para *Spodoptera exigua* en la producción de virus entomopatógenos. La pectina mostró resultados favorables de manera individual pero al igual que lo registrado por Gillespie (1993), hubo pérdida de agua desde el tercer día, por lo que el autor sugiere mezclarlo con agar-agar, de esta forma se evita la pérdida de agua. Es así como los tratamientos antes mencionados resultaron adecuados.

En el caso de la tapioca, se probaron diferentes formas de mezclarla con la dieta, pero al cabo de una semana la tapioca va perdiendo su firmeza y se vuelve líquida. Además, la tapioca se fermenta despidiendo un olor ácido penetrante que atrae mosquitos. Cuando se usa en una mezcla de 4.5g de tapioca con 0.75g de agar también se vuelve viscosa y se fermenta. Esto no fue observado por Abbasi *et al.* (2007) quienes obtuvieron buenos resultados con la tapioca sola, sin que hubiera fermentación de la dieta; sin embargo, no mencionan cómo fue preparada.

CONCLUSIONES

El cambio de recipientes para el desarrollo larval de *D. magnifactella* resultó benéfico para esta especie considerando el peso y talla de las pupas, por lo que el uso de estos recipientes, en particular aquellos con los cuatro orificios, son una buena opción en lugar de las cajas Petri. No hubo una diferencia estadística en el peso y longitud de las pupas de *D. magnifactella* cuando las larvas fueron alimentadas con sacarosa o azúcar, ambas mostraron niveles similares. Por lo que el azúcar refinada pudiera ser una buena opción para sustituir la sacarosa de grado reactivo en la dieta merídica de *D. magnifactella*.

La pectina y el agar mostraron una buena consistencia cuando se emplean de manera conjunta, por lo que pudieran utilizarse para disminuir en un 50% el consumo de agar. La pectina es un ingrediente utilizado en la industria alimentaria que puede ser adquirida de forma sencilla y a menor costo que el agar. Dado que cualquier efecto negativo derivado del uso de estos ingredientes se observaría después de varias generaciones, se recomienda continuar con este trabajo para garantizar su uso en las dietas merídicas de insectos.

LITERATURA CITADA

- Abbasi, B.H., Khalique, K., Khalique, F., Ayub, N., Liu, H.J., Kazmi, S.A.R., Nauman, M. (2007). Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* on a tapioca based artificial diet. *Journal of Insect Science*. 7: 35.
- Gillespie, D.Y. (1993). Development of mass-rearing methods for the sugarcane borer *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae) II: Diet gelling agents. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association*: 127-129pp.
- Gupta, G. P., Rani, J., Birah, A., Raghuraman, M. (2005). Improved artificial diet for mass rearing of the tobacco Caterpillar, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 25(1): 55-58.
- Hernández-Chicas, W. (2011). PARASITOIDISMO Y CONTROL MICROBIANO DEL BARRENADOR (*Diatraea saccharalis* F.) DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.), EN EL DEPARTAMENTO DE SONSONATE, EL SALVADOR, 2009. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador, El Salvador. 2p.

- Linares, B. y Salazar, J. (2007). Taladradores o barrenadores de la caña de azúcar *Diatraea* spp. Recuperado de http://plagas.miza-ucv.org.ve/index.php/plagas/ficha_detalle/285/243 consultado el 10 Julio 2013
- Ojeda-Avila, T., Woods, A. H., Raguso, R.A. (2003). Effects of dietary variation on growth, composition, and maturation of *Manduca sexta* (Sphingidae: Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology* 49: 293-306.
- Peairs, B. y Saunders J. L. (1980). *Diatraea lineolata* y *Diatraea saccharalis*: Una revisión en relación con el maíz. *Agronomía Costarricense* 4 (1): 123-135.
- Rincón, R. D. y López-Ávila, A. 2004. Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora* (Povolný) (Lepidoptera: Gelechiidae). Vol. 5. Programa Manejo Integrado de Plagas –MIP Centro de Investigación Tibaitatá. CORPOICA (1): 41-42.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A. y G. Vejar-Cota. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, pp. 9-22. En: H. C. Arredondo Bernal y L. A. Rodríguez del Bosque [eds.], *Casos de Control Biológico en México*. Ed. Mundi-Prensa, México, España.
- Romero-Corrales, A. (1981). Guía para cultivar caña en el estado de Morelos. Folleto para el productor N° 2. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de la Mesa Central. Campo Agrícola Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos, México. 12-14pp.
- Zamora, N. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioinsecticida para el control de este insecto: un análisis genético, biológico y de producción masiva. Manuscrito no publicado. Recuperado de: <https://prezi.com/ltibjyz5ew8m/copy-of-copy-of-el-nucleopoliedrovirus-de-spodoptera-exigua-lepidoptera-no/> Consultado en Diciembre 2014.