



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**ANTIMICROBIALES PARA EL CONTROL
DE HONGOS EN UNA DIETA ARTIFICIAL
Y SU IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA
Y REPRODUCCION DE *Spodoptera frugiperda*
(J. E. SMITH).**

JORGE ZAMBRANO GUTIÉRREZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

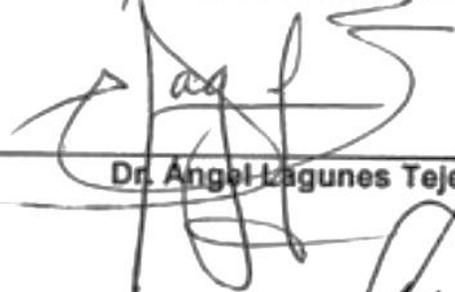
La presente tesis, titulada: **ANTIMICROBIALES PARA EL CONTROL DE HONGOS EN UNA DIETA ARTIFICIAL Y SU IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCION DE *Spodoptera frugiperda*** (J. E. SMITH), realizada por el alumno: **Jorge Zambrano Gutiérrez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

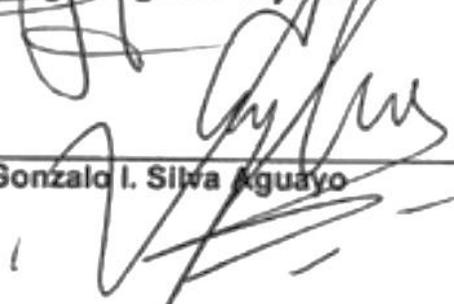
**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
_____ **Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel**

ASESOR: 
_____ **Dr. Antonio P. Terán Vargas**

ASESOR: 
_____ **Dr. Angel Lagunes Tejeda**

ASESOR: 
_____ **Dr. Gonzalo I. Silva Aguayo**

Montecillo, Texcoco, México, Julio 2013

**ANTIMICROBIALES PARA EL CONTROL DE HONGOS EN UNA DIETA
ARTIFICIAL Y SU IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCION DE
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH).**

Jorge Zambrano Gutiérrez
Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN GENERAL. Las dietas artificiales son importantes para establecer crías de insectos bajo condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, en estas condiciones también pueden la contaminación de las dietas con hongos. Para evitar la contaminación de las dietas de insectos se utilizan antimicrobiales que en algunas ocasiones ya están presentes en la dieta o bien se deben agregar a ésta. En el laboratorio de Toxicología de Insecticidas la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. se contaminaba con hongos. Así mismo se observó que al controlar la contaminación, ésta se podría utilizar en la cría masiva de *Spodoptera frugiperda*. El objetivo general del presente trabajo fue estimar la supervivencia, reproducción, duración del ciclo de vida, peso de larvas de tercer instar y pupas de *S. frugiperda* en la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. cuyo desarrollo de hongos se controló con la aplicación de antimicrobiales. Se utilizaron las dietas artificiales Southland Products Inc., Lake Village, AK., la cual ya contiene antimicrobiales y BioServ Inc., Frenchtown, NJ. Ambas dietas se evaluaron con y sin la aplicación de antimicrobiales. Los hongos que contaminaron la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. Se identificaron como *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Paecilomyces* spp. Los antimicrobiales evaluados fueron formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio. Los cuales a concentraciones de 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, fueron eficientes para controlar la contaminación. En la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin antimicrobiales las larvas murieron ya que la dieta se contaminó, mientras que benomil y cloruro de potasio fueron tóxicos para larvas en primeros estadios. Las larvas que se alimentaron de dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. sin antimicrobiales presentaron un mayor ciclo biológico, longevidad de adultos y tasa neta de reproducción (R_0). La capacidad innata de incremento (r_m) fue significativamente mayor cuando se utilizó esta dieta. Con respecto al peso de larvas en tercer instar y pupas, estos parámetros fueron significativamente inferiores cuando se aplicó de ácido sórbico y metil paraben a las dietas. Con respecto a fertilidad, esta disminuyó en adultos que emergieron de las dietas tratadas con antimicrobiales. Los antimicrobiales afectan la supervivencia y reproducción de *S. frugiperda*. Por lo cual, aunque la contaminación de la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. es controlada, debido al impacto negativo ésta no representa una alternativa viable para ser utilizada en cría masiva de *S. frugiperda*.

Palabras clave: contaminación, dietas artificiales, hongos, cría masiva, control, antimicrobiales, sobrevivencia, reproducción.

**ANTIMICROBIALS TO THE CONTROL DE FUNGI IN ONE ARTIFICIAL DIET
AND ITS IMPACT IN THE SURVIVAL AND RERODUCTION OF *Spodoptera
frugiperda* (J. E. SMITH).**

Jorge Zambrano Gutiérrez
Colegio de Postgraduados, 2013

GENERAL SUMMARY. The artificial diets are important to rear of insects under controlled laboratory conditions. However, under these conditions also favor the development of fungi that contaminate the diets and hence affect the normal development of insects. In order to avoid contamination of insect diets antimicrobial compounds are already as a part of the diet or must be added. In the laboratory of Toxicology of Insecticides, the artificial diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. Always became contaminated with fungus. Also we noted that controlling contamination; this diet could be used in the mass rearing of *Spodoptera frugiperda*. The general aim of this study was estimate the survival, reproduction, length of life cycle, weight of larvae in third instar and pupae of *S. frugiperda* in artificial diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. were fungal growth was controlled with the application of antimicrobials. We used artificial diets of Southland Products Inc., Lake Village, AK, this diet already contains antimicrobials, and the BioServ Inc., Frenchtown, NJ. These diets were evaluated with and without application of antimicrobials. The fungi that contaminated the artificial diet of Bio Serv Inc., Frenchtown, NJ. were identified as *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Paecilomyces* spp. Antimicrobials evaluated were formaldehyde, sorbic acid, methyl paraben, sodium benzoate, benomyl and potassium chloride. These compounds controlled the contamination by fungi at concentrations of 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, respectively. In the artificial diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. without antimicrobials the larvae died due to the contamination of their diet. Benomyl and potassium chloride were toxic to early stages larvae. The larvae reared on untreated Southland diet showed longer life cycle, adult longevity and net reproductive rate (R_0). The innate capacity for increase (r_m) was significantly higher on this diet. The weight of third instars larvae and pupae were significantly lower when we applied sorbic acid and methyl paraben on the diet of BioServ. Regarding fertility, it diminished in adults that emerged from diets with application of antimicrobials, which also affected the survival and reproduction of *S. frugiperda*. Although, the fungi contamination of diet BioServ may be controlled with antimicrobials, because of their negative impact it is not a viable alternative to mass rearing *S. frugiperda* larvae.

Key words: contamination, artificials diets, fungi, mass rearing, control, antimicrobials, survival, reproduction.

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón y por haber puesto en mi camino a las siguientes personas, las cuales han sido mi soporte y compañía.

A mis padres: María Elena y Salvador.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, por su apoyo en todo momento, por sus consejos, sus valores que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

Gracias!!!!

A mi hermana: Ana Isabel.

Porque has sido otra persona afectada en mis momentos difíciles; no solo eres mi hermana, también eres mi mejor amiga, consejera y lo más importante gracias a ti descubrí el amor de un hermano.

A la flaca y el flaquito.

Muchas gracias por estar conmigo y por compartir tantas cosas, solo quiero darles las gracias por todo el apoyo y comprensión que me han brindado para terminar esta etapa, sin su ayuda esto no hubiera sido posible, recuerden que son muy importantes para mí, los quiero.

A toda mi familia:

Por el amor y cariño que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al **Pueblo de México** quien a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** otorgaron el financiamiento para realizar mis estudios de posgrado.

A los integrantes de mi comité particular:

Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel por su paciencia, comprensión, observaciones y sugerencias en los momentos críticos, su apoyo fue importante para que este barco llegara a buen puerto.

Dr. Antonio P. Terán Vargas por su acertada orientación en el análisis de datos y sus enseñanzas transmitidas a lo largo de mi desarrollo profesional.

Dr. Gonzalo I. Silva Aguayo y **Dr. Ángel Lagunes Tejeda** por su apoyo, sugerencias y aportaciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

De manera especial:

Dr. Carlos A. Blanco por las observaciones realizadas al escrito final que enriquecieron la redacción, pero sobre todo por el invaluable apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de este posgrado y en los momentos difíciles.

Dr. Ausencio A. Domínguez por su amistad, ayuda brindada en el análisis de datos y observaciones realizadas al escrito, lo cual fue clave en la etapa final de este posgrado.

Me en C. Paulina Vega por su amistad, apoyo y consejos, pero sobre todo por las observaciones que enriquecieron la redacción de los manuscritos.

Dr. Daniel Nieto Ángel por su amistad, apoyo y consejos brindados a lo largo de un año, y por motivarme a terminar una etapa más de mi vida.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	ii
GENERAL SUMMARY.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVO ESPECIFICOS.....	4
HIPOTESIS.....	4
LITERATURA CITADA.....	5
 CAPITULO 1. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS QUE AFECTAN UNA DIETA ARTIFICIAL Y SU CONTROL MEDIANTE EL USO DE ANTIMICROBIALES	
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
1.1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
1.4 CONCLUSIONES.....	24
1.5 LITERATURA CITADA.....	25
 CAPITULO II. SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DEL GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EN DIETAS ARTIFICIALES CON Y SIN LA APLICACIÓN DE INHIBIDORES DE HONGOS	
RESUMEN.....	28
ABSTRACT.....	29
2.1 INTRODUCCIÓN.....	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38

2.4 CONCLUSIONES.....	52
2.5 LITERATURA CITADA.....	53
CONCLUSIONES GENERALES.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
CAPITULO 2		
1	Curvas de supervivencia (<i>lx</i>) de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentado en dos dietas artificiales aplicadas con antimicrobiales.....	40
2	Fertilidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentado en dos dietas artificiales aplicadas con antimicrobiales.....	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
CAPITULO 1		
1	Características culturales correspondientes a cada género de hongos que contaminan la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ.	18
2	Porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminada después de expuesta a diferentes concentraciones de antimicrobiales.....	21
3	Análisis Probit para el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin contaminación por efecto de los antimicrobiales.....	23
CAPITULO 2		
1	Duración y traslapo (en días) de los estados biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales.....	41
2	Esperanza media de vida (e_x) de <i>Spodoptera frugiperda</i> criado en dos dietas artificiales tratadas antimicrobiales.....	44
3	Estadísticos vitales de <i>Spodoptera frugiperda</i> criado en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales.	47
4	Límites de confianza de la r_m de <i>Spodoptera frugiperda</i> criado en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales, según prueba de Traslado de Intervalos.....	48
5	Peso promedio (mg) de larvas de tercer instar y pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales.....	51

INTRODUCCION GENERAL

Las dietas artificiales son fundamentales para la cría masiva de insectos bajo condiciones controladas de laboratorio (Gupta *et al.* 2005; Castane y Zapata 2005; Robert *et al.* 2009). Generalmente las dietas artificiales están compuestas de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y antimicrobiales (Hamed y Nadeem 2008). Mediante el uso de estas dietas comerciales, se dispone de una fuente de alimento fácil de manejar (Etzel y Legner 1999; Murúa *et al.* 2003) proporcionado de esta manera los requerimientos nutricionales mínimos para el crecimiento, supervivencia y reproducción de los insectos (Blanco *et al.* 2008). Bottger (1942) y Vanderzant *et al.* (1962) fabricaron las primeras dietas artificiales que se utilizaron para la cría del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) y el gusano bellotero (*Heliothis virescens*) Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente.

Actualmente entre las especies de importancia económica criadas con dietas artificiales se encuentran el picudo del algodnero (*Anthonomus grandis*) Boheman (Coleoptera: Curculionidae), el gusano barrenador del maíz *O. nubilalis*, la palomilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), el gusano medidor de la col *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano rosado *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) y el gusano de seda *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) (Castane y Zapata 2005; Abbasi *et al.* 2007). Con los insectos criados se realizan investigaciones para estudiar su comportamiento, ciclo de vida, hábitos de alimentación y para evaluar su respuesta a los agentes de control químico y biológico (Abbasi *et al.* 2007; Streett *et al.* 2008). En otros casos, son

empleados en la investigación biotecnológica (Murúa *et al.* 2003), control biológico (Knipling 1979; Streett *et al.* 2008) y en la alimentación humana (Defoliart 1999).

El objetivo de un programa de cría masiva de insectos es producir el máximo número posible de individuos con el mínimo de trabajo, espacio y costo; lo cual se puede llevar a cabo mediante la estandarización de los procedimientos, una eficiente producción y lo más importante una adecuada higiene (Singh 1982). Esto último contempla el control de virus, levaduras, bacterias y hongos (Bell *et al.* 1981; Singh 1982; Alverson y Cohen 2002), los cuales son el principal problema de contaminación en las dietas (Bell *et al.* 1981; Inglis y Cohen 2004). Sin embargo, debido a las condiciones controladas bajo las cuales se desarrolla este sistema de cría, las dietas son susceptibles a deteriorarse por efecto de estos microorganismos (Sikorowski *et al.* 2001; Alverson y Cohen 2002; Streett *et al.* 2008).

Esta situación provoca interrupciones periódicas (Sikorowski y Lawrence 1994; Sikorowski *et al.* 2001) ya que los microorganismos, producen cambios bioquímicos y toxinas que alteran el valor nutritivo de la dieta (Singh y House 1970; Childress y Williams 1973; Bell *et al.* 1981). Así mismo, reducen el tamaño de los insectos, retrasan su desarrollo, disminuyen la producción de feromona, el nivel de aminoácidos, y ácidos grasos, alteran el nivel de ácido úrico presente en la hemolinfa y mueren (McGown y Sikorowski 1980; Sikorowski y Thompson 1984; Wiygul y Sikorowski 1986; Sikorowski *et al.* 1992). Con la finalidad de prevenir la contaminación de las dietas se utilizan antimicrobiales (Singh y House 1970; Marler y Barras 1978; Büyükgüzel y Yazgan 2002). Entre estos destacan el formaldehído y benzoato de sodio (Singh y House 1970), ácido sórbico (Bell *et al.* 1981), benomil (Gifawesen *et al.*

1975; Bell *et al.* 1981) y metil paraben (Clark *et al.* 1961; Ouye 1962; Singh y House 1970).

Por ejemplo, el ácido sórbico y el benomil se han empleado en dieta para *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) para el control microbiano (Bell *et al.* 1981). Davidson *et al.* (2000) utilizaron metil paraben para controlar la contaminación de una dieta para *Bemisia argentifolli* (Hemiptera: Aleyrodidae). Singh y House (1970) determinaron las dosis efectivas de 21 antimicrobiales los cuales se incorporaron en una dieta artificial utilizada en la cría de *Agria affinis* Fallen (Díptera: Sarcophagidae); los resultados obtenidos indicaron que algunas de estas sustancias prologaron el desarrollo larvas y pupas. Por el contrario, Roeder *et al.* (2010)/ documentaron que larvas de *H. virescens* desarrolladas en dietas que contenían antimicrobiales como el ácido sórbico, ácido propiónico y ácido benzoico presentaron un mayor peso. Sin embargo, a pesar del uso generalizado de los antimicrobiales se han realizado pocos estudios para determinar las consecuencias que producen en los insectos (Singh y House 1970).

En el Laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología, del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. presentaba contaminación por hongos; en consecuencia se tenían problemas para utilizarla con diabroticas. Observaciones preliminares indicaban que dicha dieta se podría utilizar como alternativa para criar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae); sin embargo, la contaminación por hongos no lo permitía. El objetivo general, objetivos específicos e hipótesis del trabajo fueron los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Estimar la supervivencia, reproducción, duración del ciclo de vida, peso de larvas de tercer instar y pupas de *Spodoptera frugiperda* en la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. cuyo desarrollo de hongos en su dieta se controló con la aplicación de antimicrobiales.

Objetivos específicos:

1. Identificar taxonómica y molecularmente las especies de hongos que afectan la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ.
2. Evaluar diferentes antimicrobiales para determinar, de cada uno de ellos, la concentración que suprime el desarrollo de hongos en la dieta.
3. Comparar los datos obtenidos en la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. tratada con la concentración de cada antimicrobial con los observados en *S. frugiperda* donde se utilizó una dieta de Southland Products Inc., Lake Village, AK., misma que ya contiene antimicrobiales efectivos.

Hipótesis:

1. Los hongos que contaminan la dieta artificial pertenecen a los siguientes géneros: *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.
2. La dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. tratada con la concentración de cada antimicrobial puede ser utilizada como dieta alternativa para la cría masiva de *S. frugiperda*.

LITERATURA CITADA

- Abbasi, B., Ahmed, K., Khalique, F., Ayub, N., Liu, H., Kazmi, S., Aftab, M. 2007. Rearing the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* on tapioca based artificial diet. *J. Insect. Sci.* 7: 1 -7.
- Alverson, J. y Cohen, A. C. 2002. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.* 95: 256 - 260.
- Bell, J. V., King, G. E. y Hamalle, J. R. 1981. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis* spp. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 243 – 248.
- Blanco, C. A., Terán – Vargas, A. P., Abel, C. A., Portilla, M., Rojas, M. G., Morales – Ramos, J. A. y Snodgrass, L. G. 2008. Plant Host Effect on the Development of *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 37: 1538 – 1547.
- Bottger, G. T. 1942. Development of synthetic food media for use in nutrition studies of the European corn borer. *J. Agric. Res.* 65: 493 – 500.
- Büyükgüzel, K. y Yazgan, S. 2002. Effects of Antimicrobial Agents on the Survival and Development of Larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Reared on an Artificial Diet. *Turk. J. Zool.* 26: 111 – 119.
- Castane, C. y Zapata, R. 2005. Rearing the predatory bug *Macrolophus caliginosus* on a meat based diet. *Biol. Con.* 34: 66 – 72.
- Clark. E. W., Richmond, C. A. y McGough, J. M. 1961. Artificial media and rearing techniques for the pink bollworm. *J. Econ. Entomol.* 54: 4 – 9.
- Childress, D. y Williams, P. P. 1973. Control of a bacterial contaminant of boll weevil diet. *J. Insect. Physiol.* 66: 554 – 555.
- Davidson, E. W., Fay, M. L., Blackmer, J. y Lavine, M. 2000. Improved Artificial Feeding System for Rearing the Whitefly *Bemesia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). *Fla. Entomol.* 83: 459 – 468.
- Defoliart, G. R. 1999. Insects as food. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 21 – 50.
- Etzel, L. K. y Legner, E. F. 1999. Culture and colonization. In: T. S. Bellows & T. W. Fischer (Eds), *Handbook of Biological Control. Principles and Applications of Biological Control.* Academic Press. pp: 125-127.
- Gifawesen, C., B. R. Funke y F. I. Proshold. 1975. Control of antifungal – resistant strain of *Aspergillus niger* mold contaminants in insect rearing media. *J. Econ. Entomol.* 68: 441 – 444.
- Gupta, G. P., S. Rani y A. Birah. 2005. Mass rearing of the spotted bollworm *Earias vitella* (Lepidoptera: Noctuidae) on an artificial diet. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 25: 134 - 137.
- Hamed, M. y Nadeem, S. Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on Artificial Diets in Laboratory. *Pakistan J. Zool.* 40: 447 – 450.
- Inglis, G. D. y Cohen, A. C. 2004. Influence of antimicrobial agents on the spoilage of meat – based entomophage diet. *J. Econ. Entomol.* 97: 235 – 250.
- Knipling, E. F. 1979. The basic principles of insect population suppression and management. *Agricultural handbook.* USDA. 512 P.

- MacGown, M. W. y Sikorowski, P. P. 1980. Histopathology of midgut of mass reared, irradiated boll weevils contaminated with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp. J. Econ. Entomol. 73: 81 – 87.
- Marler, J. E. y Barras, S. J. 1978. A simple method for the production of microbe – free southern pine beetles. J. Georgia Entomol. Soc. 13: 121 – 124.
- Murúa, M. G., Virla, E. G. y Defagó, V. 2003. Evaluación de cuatro dietas para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas 29: 43 – 51.
- Ouye, M. T. 1962. Effects of antimicrobial agents on microorganisms and pink bollworm development. J. Econ. Entomol. 55: 854 – 857.
- Robert, S. C., L. Quentin y R. A. Wharton. 2009. Insects reared from the wild fruits of Kenya. J. East. Afr. Nat. History 98: 11 – 66.
- Roeder, K. A., Kuriachan I., Vinson, S. B. y Behmer, S. T. 2010. Evaluation of a microbial inhibitor in artificial diets of a generalist caterpillar *Heliothis virescens*. J. Insect. Sci. 10:197.
- Sikorowski, P. P. y Lawrence, A. M. 1994. Microbial contamination and insect rearing. Am. Entomol. 40: 240 – 253.
- Sikorowski, P. P., Inglis, G. D. y Lawrence, A. M. 2001. Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). Am. Entomol. 47: 51 – 60.
- Sikorowski, P. P., Powell, J. E. y Lawrence, A. M. 1992. Effects of bacterial contamination on development of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). Entomophaga 37: 475 – 481.
- Sikorowski, P. P. y Thompson, A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comp. Biochem. Physiol. 77: 283 – 285.
- Singh, P. 1982. The rearing of beneficial insects. New Zeal. Entomol. 7: 304 – 310.
- Singh, P. y House, H. L. 1970. Antimicrobials: “safe” levels in a synthetic diet of an insect *Agria affinis*. J. Insect Physiol. 16: 1769 – 1782.
- Strett, D. A., Ni, X. y Lawrence, M. A. 2008. Effect of DNA gyrase inhibitors in the NI diet on biological fitness of the western tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). J. Entomol. Sci. 43: 86 – 94.
- Vanderzant, E. S., Fort, S. y Richardson, C. D. 1962. Rearing of bollworm on artificial diet. J. Econ. Entomol. 55: 140 – 148.
- Wiygul, G. y Sikorowski, P. P. 1986. The effect of staphylococcal enterotoxin B on pheromone production in fat bodies isolated from male boll weevils. J. Invertebr. Pathol. 47: 116 – 119.

CAPITULO 1. IDENTIFICACION DE LOS HONGOS QUE AFECTAN UNA DIETA ARTIFICIAL Y SU CONTROL MEDIANTE EL USO DE ANTIMICROBIALES.

Jorge Zambrano Gutiérrez

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN. Para resolver el problema de contaminación de las dietas artificiales se utilizan antimicrobiales. En el presente trabajo se identificaron los hongos que contaminan la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. y se evaluaron antimicrobiales para determinar, de cada uno de ellos, la concentración que controla la contaminación. Los antimicrobiales evaluados fueron formaldehído, ácido sórbico, benzoato de sodio, metil paraben, benomil y cloruro de potasio. Para cada antimicrobial se evaluaron siete diferentes concentraciones y un testigo, para tal efecto, se depositaron 200 μL del antimicrobial y la concentración respectiva sobre la superficie de la dieta artificial BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. contenida en cavidades de una charola para bioensayo. El tamaño de muestra fue de 16 cavidades por dosis por concentración. Las charolas se colocaron a 27 ± 2 °C, 70 ± 10 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad por 7 días. La variable evaluada porcentaje de cavidades con y sin contaminación. Para determinar si existía correlación entre las concentraciones evaluadas y el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminadas por hongos se realizó un análisis de correlación de Pearson. Para estimar la CL_{99} el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin contaminación se sometió a un análisis probit. Los hongos que contaminaron la dieta

fueron identificados como *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Paecilomyces* spp. Las concentraciones de formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio que redujeron la contaminación de la dieta a un nivel del 100 % fueron 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, respectivamente.

Palabras clave: dieta artificial, contaminación, hongos, identificación, control, antimicrobiales.

CHAPTER 1. IDENTIFICATION OF FUNGI AFFECTING ONE ARTIFICIAL DIET AND ITS CONTROL WITH THE APPLICATION OF ANTIMICROBIALS.

Jorge Zambrano Gutiérrez

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT. To solve the problem of microbial contamination of artificial diets antimicrobials are used. We identified the fungi that contaminate the diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. and we evaluated different antimicrobials to determine the concentration controlling the contamination. Antimicrobials evaluated were formaldehyde, sorbic acid, sodium benzoate, methyl paraben, benomyl and potassium chloride. For each antimicrobial evaluated, seven different concentrations and the control, for that purpose 200 μ L were deposited of the respective antimicrobial and concentration on the surface of the artificial diet BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. contained in wells of a bioassay tray. The sample size was 16 cavities per dose concentration. The trays were placed at 27 ± 2 ° C, $70 \pm 10\%$ relative humidity and a photoperiod of 12:12 h light: dark for 7 days. We evaluated percentage of cavities with and without contamination. To determine the correlation between the concentrations tested and the percentage of cavities with diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminated by fungi was performed Pearson correlation analysis. To estimate CL_{99} the percentage of cavities diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. no contamination was subjected to probit analysis. The fungus that contaminated the artificial diet were identified as *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*,

Aspergillus westerdijkiae y *Paecilomyces* spp. Concentrations of formaldehyde, sorbic acid, methyl paraben, sodium benzoate, benomil and potassium chloride which reduced pollution diet at a level of 100% was 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 and 4.0%, respectively.

Key words: artificial diet, contamination, fungus, identification, control, antimicrobials.

1.1 INTRODUCCIÓN

Las especies de insectos de importancia económica generalmente se crían con dietas artificiales (McKinley 2004, Robert *et al.* 2009); estos insectos se emplean en estudios para conocer su fisiología, ecología y genética. También se utilizan para desarrollar nuevos métodos de control sobre las principales plagas agrícolas, como la técnica del macho estéril, manipulación de hormonas y feromonas, producción de hongos entomopatógenos y los programas de control biológico e integrado (Mabrouk *et al.* 2001, Khodaverdi *et al.* 2010). Estos estudios requieren del abastecimiento de insectos sanos, en grandes cantidades y periodos específicos (Alverson y Cohen 2002, Fortes *et al.* 2006).

En este sistema de cría la temperatura, cantidad de alimento y humedad relativa se mantienen constantes (Arévalo y Zenner de Polanía, 2010), debido a ello es posible la cría continua entre cada generación (Alverson y Cohen 2002, Elvira *et al.* 2010). Sin embargo, surgen problemas que ocasionan interrupciones en la producción y el suministro de insectos (Ni y Streett 2005, Streett *et al.* 2008), el principal es la formación y el crecimiento de hongos, los cuales provocan el deterioro de las dietas (Hoover *et al.* 1997, Ni y Streett 2005, Arévalo y Zenner, 2010). Por esta situación, los individuos a reproducir no se adaptan a su medio de alimentación y mueren (Büyükgüzel y Yazgan 2002) a causa de daños en el desarrollo, la aptitud biológica y el potencial reproductivo (Gueldner *et al.* 1977, McLaughlin y Sikorowski 1978; Sikorowski y Thompson 1984).

Ouye *et al.* (1962) documentó que *A. niger* y *A. flavus* contaminaron una que se empleó para criar *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Noctuidae). *A. niger*, *A.*

flavus, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizopus nigricans* contaminaron una dieta que se utilizó para la cría de *Heliothis* spp (Bell *et al.* 1981). El control de los hongos en las dietas artificiales es una parte integral de los sistemas de cría bajo condiciones de laboratorio; de esta manera se mantienen a las colonias de insectos sanas y se obtienen resultados significativos en aquellos estudios donde se utilizan dichos especímenes (Cohen 2003; Roeder *et al.* 2010; Trivedy *et al.* 2011).

Las dietas artificiales están compuestas de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, grasas y glucosa (Hamed y Nadeem 2008; Alfazairy *et al.* 2012). Así mismo, para prevenir o suprimir la contaminación se añaden antimicrobiales (Singh 1982; Andow y Stodola 2001; Alverson y Cohen 2002). Büyükgüzel (2001) añadió a una dieta para criar *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) mezclas de metil paraben, estreptomycin, nistatina, rifampicina, cicloheximida y penicilina con el objetivo de controlar hongos y bacterias. McLaughlin y Keller (1964) emplearon novabiocina y tetraciclina para eliminar *Serratia marcescens* de una dieta que se utilizó para criar *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). El formaldehído, benzoato de sodio, ácido sórbico, benomil y metil paraben se han utilizado para controlar el crecimiento de hongos en las dietas artificiales (Clark *et al.* 1961; Ouye 1962; Singh y House 1970a; Gifawesen *et al.* 1975; Bell *et al.* 1981).

Las dietas que se utilizaron para la cría de *O. nubilalis*, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) contenían algunos de estos antimicrobiales (Guthrie 1965; Alfazairy *et al.* 2010). Bordat y Pichot (1978), y Taneja y Nwanze (1990) incorporaron ácido sórbico y metil paraben a las dietas artificiales utilizadas para la cría de *Chilo partellus*

(Swinhoe), *C. orichalcociliellus* (Strand) y *C. zacconius* (Blesz) (Lepidoptera: Pyralidae). El ácido sórbico, benomil y metil paraben las utilizó Bell *et al.* (1981) para controlar la contaminación en una dieta que fue empleada para criar *Heliothis* spp.

La efectividad de un antimicrobial se basa en su espectro de acción y consiste en evaluar el efecto de diferentes concentraciones sobre el crecimiento del o de los hongos presentes en las dietas artificiales (Davidson y Branen 2005). Estudios al respecto se realizaron por Trivedy *et al.* (2011) quienes determinaron que el formaldehído al 2 % controló el desarrollo de hongos en crías de *B. mori*. Lewis y Raun (1966), Lewis y Lynch (1969), y Howell y Clift (1972) utilizaron el ácido sórbico a concentraciones del 0.05 %, 0.2 % y 1 %, respectivamente, para contrarrestar la contaminación de una dieta artificial. Singh y House (1970a) determinaron las dosis efectivas de 21 antimicrobiales, los cuales se incorporaron a una dieta que se utilizó para la cría de *A. affinis*. Alverson y Cohen (2002) evaluaron diversas concentraciones de ácido benzoico, formaldehído, metil paraben, ácido propionico y ácido sórbico los cuales se adicionaron a una dieta para la cría de *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae).

En el Laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. presentaba contaminación por hongos. Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron identificar taxonómica y molecularmente las especies de hongos que afectaban la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. y evaluar diferentes antimicrobiales para determinar, de cada uno de ellos, la concentración que controla la contaminación de la dieta por hongos.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. De cada colonia fungosa predominante en la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. se realizó una suspensión de conidios de donde se obtuvieron 100 μ L que se esparcieron con la ayuda de una varilla de vidrio estéril en cajas Petri con medio de cultivo papa – dextrosa – agar (PDA). Posteriormente, las cajas que contenían los conidios se incubaron por 24 h bajo condiciones de laboratorio.

Purificación de cepas. Después del periodo de incubación, de cada aislamiento se obtuvo un conidio germinado que se transfirió a nuevas cajas con PDA para la formación de cultivos monospóricos.

Identificación cultural. Se partió de cultivos monospóricos. Las colonias desarrolladas en cajas Petri se observaron en un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss 37081 Göttingen Germany) para definir coloración. Enseguida, se realizaron montajes permanentes con glicerol al 50 %, los cuales se observaron en un microscopio compuesto (Carl Zeiss 37081 Göttingen Germany), se definió color, forma y presencia de esporas u otras estructuras reproductivas de los hongos. La identificación a nivel de género se realizó con base en las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

Identificación molecular. En el Laboratorio General de Biología Molecular del programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, estado de México; el DNA de cultivos monospóricos correspondiente a cada aislamiento se obtuvo mediante el protocolo DNeasy[®] Mini Kit (QUIAGEN).

Protocolo de extracción del DNA. Para la extracción del DNA primeramente de cada aislamiento monospórico se tomó una muestra de micelio que se transfirió a un

tubo eppendorf y se macero con una aguja de cristal. A cada muestra se le añadieron 400 μ L de Buffer AP1 y cuatro μ L de RNasa; enseguida las muestras se agitaron ligeramente e incubaron en baño María por 10 min a 65 ° C, se realizó una agitación por inversión cada 2 min. Posteriormente, a las muestras se les adiciono 130 μ L del buffer AP2 e incubaron por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm. Se retiró el sobrenadante para colocarlos en un nuevo tubo eppendorf, al que se le adiciono 675 μ L del buffer AP3/E. La mezcla se colocó en un tubo DNeasy Mini spin, y se sometió a centrifugación por 1 min a 8 000 rpm. Cada columna se reemplazó por otra suplementaria del protocolo, se agregaron 500 μ L del buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm. Nuevamente, se cambió la columna en el filtrado, se añadieron a la membrana 500 μ L del buffer AW y se realizó una centrifugación por 2 min a 14, 000 rpm con la finalidad de eliminar impurezas del ADN. Finalmente, la columna DNeasy Mini spin se colocó en un tubo eppendorf y se añadieron directamente a la membrana 100 μ L del buffer AE del DNeasy, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm (QIAGEN, 2006). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Amplificación del DNA mediante PCR. La amplificación del ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la combinación de los iniciadores universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.* 1990). La amplificación y visualización de los productos se realizó con el protocolo de GoTaq Flexi DNA Polymerase de Promega (2013) con las siguientes modificaciones en las reacciones

de PCR: agua estéril ionizada (12.145 μ L), solución amortiguadora TBE 1X (4 μ L), $MgCl_2$ a 1.5 mM (2.75 μ L), dNTP's a 0.2 mM (1.375 μ L), *Taq* DNA – polimerasa 1.5 unidades (0.33 μ L), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 pM (1 μ L de cada uno) y muestra de ADN a una concentración de 20 ng (1 μ L). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador marca Perkin Elmer con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante cinco min por un ciclo, la amplificación a 95 °C por 45 segundos, 57 ° C por 45 segundos y 72 °C por dos min por 30 ciclos y la elongación se realizó a 72 ° C por cinco min por un ciclo. El producto amplificado se secuenció en la empresa MACROGEN (Taiwan). Para definir con exactitud las especies correspondientes a cada aislamiento, las secuencias obtenidas se alinearon en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013). El mayor porcentaje de similitud con las secuencias del banco se utilizó para la identificación.

Antimicrobiales. Se utilizó formaldehído (33.50 %), ácido sórbico (99.40 %), benzoato de sodio (100.00 %), metil paraben (100.00 %), benomil (50.00 %) y cloruro de potasio (49.40 %). Estos antimicrobiales han sido utilizados por Clark *et al.* (1961); Singh y House (1970a); Gifawesen *et al.* (1975) y Bell *et al.* (1981) para controlar la contaminación por hongos en diferentes dietas artificiales.

Procedimiento experimental. Con un dispensador manual (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se colocó un mililitro de dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. en cada cavidad de una charola para bioensayo (BAW - 128, C - D International, Pitman, NJ). Una hora después que la dieta solidificó y enfrió, con una micropipeta automática Multipette[®] (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se depositaron 200 μ L de la concentración requerida de cada antimicrobial, sobre la superficie de la dieta

artificial contenida en cada cavidad. Después de 24 h las cavidades se cubrieron con un plástico transparente autoadherible (BIO – CV – 16, C - D International) y las charolas se colocaron a 27 ± 2 °C, 70 ± 10 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad. Para obtener una solución homogénea, cada concentración se agitó en un mezclador magnético (Thermolyne, Cimarec) durante una hora antes de preparar la siguiente solución o cinco minutos antes de ser depositada sobre la dieta, el disolvente empleado fue agua destilada estéril. A los siete días después de haber tratado la dieta con la concentración deseada de cada antimicrobial, se evaluó el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. con y sin contaminación por hongos. Primeramente se determinó el intervalo entre el 0 a 100 % de respuesta en cada ensayo, enseguida se introdujeron siete dosis intermedias que cubrieron dicho intervalo. Para las concentraciones evaluadas de cada antimicrobial se realizaron seis repeticiones en días diferentes, cada una constituida de 16 cavidades. Cada repetición incluyó un testigo el cual se aplicó con 200 μ L de agua destilada estéril.

Análisis estadístico. Para determinar si existía correlación entre las concentraciones evaluadas y el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminada por hongos se realizó un análisis de correlación de Pearson ($\text{Prob} > |R| \leq 0.05$). Para estimar la CL_{99} el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin contaminación se sometió a un análisis Probit (Finney, 1971) mediante el procedimiento PROC PROBIT. Ambos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

1.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

Identificación cultural. Se obtuvieron cinco aislamientos: BIOSERV01, BIOSERV02, BIOSERV03. BIOSERV04, BIOSERV05 y BIOSERV 6. De acuerdo con las características descritas por las claves especializadas se identificaron cinco géneros (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características culturales correspondientes a cada género de hongos que contaminan la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ.

Aislado	Características culturales	Género
BIOSERV01	Crecimiento abundante, conidióforos ramificados, fiálides agrupadas en forma de cepillo, conidios unicelulares, hialinos y globosos.	<i>Penicillium</i>
BIOSERV02 y BIOSERV04	Micelio blanco el cual pasa a anaranjado, conidióforos en posición vertical con terminación globosa, y fiálides en el ápice, conidios unicelulares.	<i>Aspergillus</i>
BIOSERV03	Abundante producción de ascomas, ascas cilíndricas. Ascosporas unicelulares, esféricas y hialinas.	<i>Neurospora</i>
BIOSERV05	Conidióforos más esparcidos que <i>Penicillium</i> , los conidios agrupados en cadenas, unicelulares, ovoides y hialinos.	<i>Paecilomyces</i>
BIOSERV06	Conidióforos oscuros, ramificados, verticales, solos o agrupados, conidios unicelulares o bicelulares, de forma ovoide o cilíndrica, agrupados en cadenas.	<i>Cladosporium</i>

Identificación molecular. El análisis molecular que se realizó para cada uno de los aislamientos confirmó a: *Penicillium commune* (BIOSERV01), *Aspergillus ochraceus* (BIOSERV02), *Neurospora tetrasperma* (BIOSERV03) y *Aspergillus westerdijkiae* (BIOSERV04) como las especies de hongo que se desarrollaron en la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. La homologación con las secuencias de *P. commune*, *A. ochraceus*, *N. tetrasperma* y *A. westerdijkiae* depositados en el banco de genes (NCBI) con numero de acceso DQ132814, JX414214, GU062212 y HQ843035 fue del 99, 100, 99 y 99 %, respectivamente. Por otra parte, por ITS la secuencia de *Paecilomyces penicillatus* (JX414214) presentó un 83 % de similitud al ser comparada con la secuencia del aislamiento BIOSERV05 por lo cual molecularmente son especies diferentes. El aislado BIOSERV06 no se logró identificar a nivel de especie ya que puede ser una especie desconocida o quizás la secuencia aún no ha sido depositada en el banco de genes. En la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. la contaminación se debe a que carece de antimicrobiales y una vez que esta se prepara y es colocada en condiciones controladas la presencia de hongos comienza a ser notable a los tres a cinco días. Estos microorganismos descomponen la dieta y ocasionan la mortalidad de larvas que se alimentan de este medio. A nivel de género, los hongos que contaminaron la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. se han documentado como contaminantes de otras dietas artificiales. Strett *et al.* (2008) indican que *Aspergillus niger* es el principal hongo que contamina las dietas artificiales de insectos, Proverbs *et al.* (1982) documentaron su presencia en una dieta para *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae), lo cual ocasionó la mortalidad de larvas. Mientras que *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. se desarrollaron en una dieta artificial y provocaron

la mortalidad de larvas neonatas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Arévalo y Zenner de Polanía 2010). *A. tamaritii*, *A. flavus*, *A. niger*, *Neurospora* spp., *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Rhizopus* spp. y *Cladosporium* spp. se aislaron de dietas utilizadas para alimentar a *Bombyx mori* L. (Lepidóptera: Noctuidae) (Trivedy *et al.* 2011).

Efecto de los antimicrobiales sobre la contaminación de la dieta. Con base en los resultados obtenidos (Cuadro 2), el coeficiente de correlación de Pearson es diferente de cero ($\text{Prob} > |R| < 0.05$). Los valores del coeficiente de correlación (r) fueron negativos, por lo cual existe una correlación negativa entre las concentraciones evaluadas de los antimicrobiales y el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminada por hongos. De acuerdo con Castillo (2007) cuando el coeficiente de correlación se aproxima a 1 o -1 existe mayor evidencia de que la variable X contribuye de manera significativa a explicar la variable Y. En el presente ensayo los valores del coeficiente de correlación oscilaron entre -0.88 a -0.97, por lo cual, al aumentar la concentración de los antimicrobiales el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminada disminuyó. Las concentraciones de formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio que redujeron la contaminación de la dieta a un nivel del 100 % fueron 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, respectivamente. Trivedy *et al.* (2011) documentaron que una solución de formaldehído al 0.2 % fue eficiente para controlar la contaminación por *A. tamaritii*, *A. flavus*, *A. niger*, *Neurospora* spp., *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Rhizopus* spp. y *Cladosporium* spp. en una dieta para criar *B. mory*.

Cuadro 2. Porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. contaminada después de expuesta a diferentes concentraciones de antimicrobiales[¶].

Concentraciones	Porcentaje de cavidades contaminadas	Concentraciones	Porcentaje de cavidades contaminadas
Formaldehído†		Benzoato de sodio	
0.0	100.00	0.0	100.00
0.01	100.00	1.0	100.00
0.025	83.33	1.5	75.00
0.062	46.88	2.0	59.38
0.16	22.92	2.5	35.42
0.38	0.00	2.8	16.67
0.94	0.00	3.0	0.00
2.5	0.00	3.3	0.00
Prob > R	0.0008	Prob > R	0.0002
r‡	-0.93135	r	-0.95581
Ácido sórbico		Benomil	
0.0	100.00	0.0	100.00
1.0	100.00	2.0	100.00
1.5	83.33	3.0	64.58
2.0	50.00	3.3	43.75
2.3	20.00	3.5	19.79
2.5	0.00	3.8	0.00
2.8	0.00	4.0	0.00
3.0	0.00	4.2	0.00
Prob > R	0.0008	Prob > R	0.0037
r	-0.92950	r	-0.88245
Metil paraben		Cloruro de potasio	
0.0	100.00	0.0	100.00
1.0	100.00	1.0	100.00
1.8	79.17	2.0	70.83
2.0	59.38	3.0	47.92
2.3	38.54	3.5	26.04
2.5	19.79	3.8	10.42
2.8	0.00	4.0	0.00
3.0	0.00	4.3	0.00
Prob > R	0.0014	Prob > R	<.0001
r	-0.91533	r	-0.97149

[¶] Las evaluaciones se realizaron a los siete días después de la aplicación.

† Antimicrobiales evaluados.

‡ Coeficiente de correlación de Pearson.

n = 96 cavidades por concentración evaluada en cada antimicrobial.

Roeder *et al.* (2010) establecieron que el formaldehído al 0.1 %, en combinaci3n con 3cido s3rbico, 3cido fosf3rico, 3cido propi3nico, 3cido benzoico y cloranfenicol redujo la contaminaci3n de una dieta a base de frijol pinto para la cría de *H. virescens*. Brazzel *et al.* (1959) documentaron que el metil paraben y 3cido s3rbico, al 0.2 y 0.15 % respectivamente fueron eficientes para inhibir la contaminaci3n de una dieta empleada en la cría de *A. grandis* con un mínimo efecto negativo sobre el insecto. Por otra parte, Singh y House (1970a) determinaron que 0.432, 10 y 100 mg 100 ml de dieta⁻¹ fueron las concentraciones que controlaron la contaminaci3n en una dieta para *A. affinis*. El uso de antimicrobiales contempla dos aspectos importantes: 1) controlar la contaminaci3n de la dieta y 2) que al ser incorporados a las dietas artificiales no causen efectos adversos sobre los insectos. Esto último generalmente depende de la concentraci3n utilizada (Singh y House 1970a). Alverson y Cohen (2002) determinaron que la contaminaci3n por *A. niger* en una dieta para la cría de *L. hesperus* fue controlada con el uso de formaldehído a 500, 1000 y 1500 ppm, y metil paraben a 1000, 1500 y 2000 ppm, sin embargo estas concentraciones afectaron ciertos parámetros reproductivos del insecto. En el caso de lepidópteros, se deben realizar ensayos para determinar si la supervivencia o reproducci3n del insecto no es afectada cuando las larvas se alimentan de dietas que contienen antimicrobiales. Cada antimicrobial presenta un diferente modo de acci3n (Andow y Stodola 2001). El formaldehído destruye la membrana celular del hongo (Rossmoore y Sondossi 1988) e inactiva a los microorganismos mediante la desnaturalizaci3n de las proteínas y la alquilaci3n de los 3cidos nucleicos. Este modo de acci3n es similar dentro del 3cido nucleico y desoxirribonucleico (Maris 1995). El 3cido s3rbico interfiere en el

metabolismo de los carbohidratos, se une al grupo – SH de las enzimas y desestabiliza la membrana celular del hongo. El metil paraben, inhiben la absorción de nutrientes esenciales y aminoácidos, y destruye la membrana celular (Lück y Jager, 1997), su efecto aumenta conforme la longitud de su cadena alquílica es mayor (Davidson 2005). El benzoato de sodio, interfiere en la permeabilidad de la membrana celular del hongo, evitando el transporte de nutrientes, con lo cual, se lleva a cabo un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Freese *et al.* 1973), daña sistemas específicos de las enzimas en las células del hongo (Webb, 1966) y actúa sobre la absorción de aminoácidos (Hunter y Segel 1973).

Cuadro 3. Análisis Probit para el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin contaminación por efecto de los antimicrobiales.

Antimicrobial	n	Pendiente ± SE†	CL ₉₉ µL mL ⁻¹ (LF 95%¶)	Pr >x ² ‡
Formaldehido	96	2.63 ± 0.27	0.49 (0.31 – 1.09)	<.0001
Ácido sórbico	96	12.58 ± 1.86	2.89 (2.58 – 3.64)	<.0001
Metil paraben	96	13.93 ± 1.64	3.09 (2.83 – 3.62)	<.0001
Benzoato de sodio	96	8.07 ± 1.41	3.92 (3.20 – 6.37)	<.0001
Benomil	96	23.79 ± 3.19	3.98 (3.77 – 4.40)	<.0001
Cloruro de potasio	96	7.46 ± 1.52	5.32 (4.27 – 9.95)	<.0001

† Error estándar de la pendiente.

¶ Límites de confianza correspondientes al 95 %.

‡ Probabilidad de que la línea log dosis – Probit ajuste a una línea recta.

Los resultados del análisis Probit se indican en el Cuadro 3, en el cual se indican las concentraciones, para cada antimicrobial evaluado, que mantiene el porcentaje de cavidades con dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin contaminación a un nivel de 99 (CL₉₉). Los hongos que contaminan la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. fueron más sensibles al formaldehído, seguidos por el ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio, con valores de CL₉₉ de 0.49, 2.89, 3.09, 3.92, 3.98 y 5.32 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. El valor de la pendiente en el mismo orden para cada antimicrobial fue de 2.63, 12.58, 13.93, 8.07, 23.79 y 7.46.

1.4 Conclusiones

Los hongos que contaminaron la dieta artificial fueron identificados cultural y molecularmente como *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Paecilomyces* spp. El formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio a concentraciones de 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, respectivamente, fueron eficientes para controlaron la contaminación de la dieta. Observaciones preliminares indicaban que una vez contralada la contaminación, la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. se podría utilizar como alternativa para criar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Sin embargo, no existen reportes sobre el efecto de estos antimicrobiales en la supervivencia y reproducción de *S. frugiperda*.

1.5 LITERATURA CITADA

- Alfazairy, A. A., Sadek, H. A., Guirguis, G. Z. y Karam, H. H. 2012. An agar – free artificial diet: A new approach for the low cost mass rearing of the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Agric. Sci. Res. J. 2: 639 – 647.
- Alverson, J. y Cohen, C. A. 2002. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). J. Econ. Entomol. 95: 256 – 260.
- Andow, D. A. y Stodola, T. J. 2001. Detecting subtle effects of diet preservatives on European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). J. Entomol. Sci. 36: 285 – 296.
- Arévalo, M. H. y Zenner de Polanía, I. 2010. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U. D. C. A. Act. & Div. Cient. 13: 163 – 173.
- Barnett, L. H. y B. B. Hunter. 2006. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Bell, J. V., King, G. E. y Hamalle, J. R. 1981. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis* spp. J. Invertebr. Pathol. 37: 243 – 248.
- Bordat, D. y Pichot, M. 1978. *Chilo zacconius* (Blesz). Rearing technique on an artificial medium and observations in its biology in the laboratory. Agron. Trop. 33: 337-343.
- Brazzel, J. R., Davich, T. B. y Raven, K. 1959. Rearing boll weevils on an artificial diet. Misc. Publs. Tex. Agric. Exp. Sta. N° 353.
- Büyükgüzel, K. 2002. Antimicrobial agents: their combined effects on total protein content of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). Turk. J. Zool. 26: 229 – 237.
- Büyükgüzel, K. y Yazgan, S. 2002. Effects of Antimicrobial agents on the Survival and Development of Larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Reared on an Artificial Diet. Turk. J. Zool. 26: 111 – 119.
- Castillo, M. E. 2007. Introducción al SAS para Windows. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México. 295 p.
- Clark, E. W., Richmond, C. A. y McGough, J. M. 1961. Artificial media and rearing techniques for the pink bollworm. J. Econ. Entomol. 54: 4 – 9.
- Cohen, A. C. 2003. Insects Diets: Science and Technology. CRC Press.
- Elvira, S., Gorriá, N., Muñoz, D., Williams, T. y Caballero, P. 2010. A simplified low – cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production. J. Econ. Entomol. 103: 17 - 24.
- Fortes, P., Sandra, M. R., Panizzi, A. R. y Antonio Parra, J. R. P. 2006. Development of dry artificial diet for *Nezara viridula* (L.) and *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 35: 567 – 572.

- Gifawesen, C., B. R. Funke y F. I. Proshold. 1975. Control of antifungal – resistant strain of *Aspergillus niger* mold contaminants in insect rearing media. J. Econ. Entomol. 68: 441 – 444.
- Gueldner, R. C., P. P. Sikorowski y J. M. Wyatt. 1977. Bacterial load and pheromone production in the boll weevil *Anthonomus grandis*. J. Invertebr. Pathol. 29: 397 – 398.
- Guthrie, W. D., E. S. Raun, F. F. Dicke, G. R. Pesho y S. W. Carter. 1965. Laboratory production of European corn borer egg masses. J. Sci. 40: 65 – 83.
- Hamed, M. y Nadeem, A. 2008. Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on artificial diets in laboratory. Pakistan J. Zool. 40: 447 – 450.
- Hoover, K., Schultz, C. M., Lane, S. S., Bonning, C. B., Hammock, D. B. y Duffey, S. S. 1997. Effects of diet – age and streptomycin on virulence of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus against the Tobacco Budworm. J. Invertebr. Pathol. 69: 46 - 50.
- Howell, J. F. y Clift, A. E. 1972. Rearing condling moths on an artificial diet in trays. J. Econ. Entomol. 65: 888 – 890.
- Khodaverdi, H., Sahragard, A., Moafi, M. A. y Neyshabouri, J. M. 2010. A study ofn the demographic parameters of Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep: Noctuidae) fed ion artificial diet and under laboratory conditions. Iranian J. Plant Protection Science 41: 61 – 69.
- Lewis, L. C. y E. R. Raun. 1966. Consumption and utilization of laboratory diets by European corn borer. J. Sci. 41: 173 - 180.
- Lewis, L. C. y R. E. Lynch. 1969. Rearing the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) on diets containing corn leaf and wheat germ. J. Sci. 44: 9 – 14.
- Lück, E. y M. Jager. 1997. Antimicrobial food additives: Characteristics, uses, effects. 2nd edition. Berlin, Alemania. 260 p.
- Mabrouk, A., Bekeheit, H. K. M. y El – Hussein, M. M. 2001. Economic diet for rearing *Spodoptera littoralis* (Boisd.), used for production of the nuclear polyhedrosis virus. Egypt. J. Biol. Pest Control 11: 127 – 134.
- Maris, P. 1995. Modes of action of disinfectants. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 14 (1): 47 – 55.
- McKinley, D. J. 2004. An introduction to the use and preparation of artificial diets with special emphasis on diets for phytophaguos *Lepidoptera*. Int. J. Pest. Manage. 17: 421 – 424.
- McLaughlin, R. E. y Keller, J. C. 1964. Antibiotic control of an epizootic caused by *Serratia marcescens* Bizio in the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman. J. Insect. Pathol. 6: 481 – 485.
- McLaughlin, R. E. y P. P. Sikorowski. 1978. Observations of boll weevil midgut when fed natural food or on bacterially contaminated artificial diet. J. Invertebr. Pathol. 32: 64 – 70.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2013. Gen Bank. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado el 15 de abril de 2013.

- Ni, X. y Streett, D. A. 2005. Modulation of water activity on fungicide effect on *Aspergillus niger* growth in Sabouraud dextrose agar medium. Lett Appl Microbiol 41: 428 – 433.
- Ouye, M. T. 1962. Effects of antimicrobial agents on microorganisms and pink bollworm development. J. Econ. Entomol. 55: 854 – 857.
- Proverbs, M. D., Newton, J. R. y Campbell, B. E. 1982. Codling moth: a pilot program of control by sterile insect release in British Columbia. Can. Entomol. 114: 363 – 376.
- Robert, S. C., L. Quentin y R. A. Wharton. 2009. Insects reared from the wild fruits of Kenya. J. East. Afr. Nat. History 98: 11 – 66.
- Roeder, K. A., Kuriachan, I., Vinson, S. B. y Behmer, S. T. 2010. Evaluation of a microbial inhibitor in artificial diets of a generalist caterpillar *Heliothis virescens*. Journal of Insect Science 10:197 available online: insectscience.org/10.197.
- Rossmore, H. W. y Sondossi, M. 1988. Applications and more of action of formaldehyde condensate biocides. Adv. Appl. Microbiol. 33: 223 – 277.
- Sikorowski, P. P. y Thompson, A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comp. Biochem. Physiol. 77: 283 – 285.
- Singh, P. 1982. The rearing of beneficial insects. New Zeal. Entomol. 7: 304 – 310.
- Singh, P. y House, H. L. 1970a. Antimicrobials: “safe” levels in a synthetic diet of an insect *Agria affinis*. J. Insect Physiol. 16: 1769 – 1782.
- Singh, P. y House, H. L. 1970b. Antimicrobials agents: their detrimental effects on size of an insect *Agria affinis*. Can. Entomol. 16: 1769 – 1782.
- Streett, D. A; Ni. X. y Lawrence, A. M. 2008. Effect of DNA gyrase inhibitors in the NI diet on Biological fitness of the western tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). J. Entomol. Sci. 43 (1): 86 – 94.
- Taneja, S. L. y Nwanze, K. F. 1990. Mass rearing of *Chilo* spp. on artificial diets and its use in resistance screening. Insect. Sci. Aplic. 11: 605 – 616.
- Trivedy, K., Nirmal, K. S., Vinutha, N. y Qadri, S. M. H. 2011. *In vitro* testing of common disinfectants used in sericulture to control the growth of fungi in rearing houses. Res. J. Microbiol. 6 (5): 439 – 465.
- Webb, J. L. 1966. Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 245.
- White, T. J., T. Bruns. S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. A Guide to Method and Applications. M. A. Inni, D. H. Gelfand, J. J. Sninski y T. J. White, (eds). Academic Press, San Diego, CA. pp: 315 – 322.

**CAPITULO 2. SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DEL GUSANO COGOLLERO,
Spodoptera frugiperda Smith (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), EN DIETAS
ARTIFICIALES CON Y SIN LA APLICACIÓN DE INHIBIDORES DE HONGOS.**

Jorge Zambrano Gutiérrez, MC

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN. Las dietas artificiales que se utilizan para reproducir insectos con frecuencia se contaminan de hongos que deterioran su calidad. Para resolver este problema se utilizan sustancias inhibidoras de estas formas de vida, cuidando que no afecten a la especie del insecto en cuestión. Los objetivos del presente trabajo fueron estimar la supervivencia, reproducción, duración del ciclo de vida, peso de larvas de tercer instar y pupas de *Spodoptera frugiperda* en la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. cuyo desarrollo de hongos se controló con la aplicación de antimicrobiales. Los datos se compararon con los observados en *S. frugiperda* donde se utilizó una dieta de Southland Products Inc., Lake Village, AK., misma que ya contiene antimicrobiales efectivos. Ambas dietas se evaluaron con y sin aplicación de formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil o cloruro de potasio. En dieta BioServ sin antimicrobiales las larvas murieron debido a que la dieta se contaminó con hongos. Benomil y cloruro de potasio fueron tóxicos para larvas en los primeros estadíos. Larvas que se alimentaron de la dieta no tratada de Southland presentaron un ciclo biológico más largo y una mayor longevidad de adultos y tasa neta de reproducción (R_0). La capacidad innata de incremento (r_m) fue

significativamente mayor cuando se utilizó esta dieta. El peso de larvas en tercer instar y pupas fueron significativamente inferiores cuando se aplicó ácido sórbico y metil paraben a la dieta BioServ. Con respecto a fertilidad, ésta disminuyó cuando los adultos emergieron de las dietas tratadas con antimicrobiales, los cuales afectaron la supervivencia y reproducción de *S. frugiperda*. Por lo cual, aunque la contaminación con hongos de la dieta BioServ se puede controlar con antimicrobiales, ésta no representa una alternativa viable para la cría masiva de larvas de *S. frugiperda*.

Palabras clave: contaminación, dietas artificiales, hongos, control, antimicrobiales, *S. frugiperda*, supervivencia, reproducción

CHAPTER 2. SURVIVAL AND REPRODUCTIVE PARAMETERS OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) REARED IN ARTIFICIAL DIETS WITH AND WITHOUT THE APPLICATION OF FUNGI - INHIBITORY SUBSTANCES.

Jorge Zambrano Gutiérrez, MC

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT. The artificial diets used to rear insects are usually contaminated with fungi that affect their quality. To solve this problem, fungi - inhibitory substances are used, taking care to avoid any negative effects on the species of insects. In this study, we estimated the survival, reproduction, cycle duration and weight of third instar larvae and pupae of *Spodoptera frugiperda* Smith reared on the artificial diet BioServ Inc., Frenchtown, NJ. treated to prevent the growth of fungi. The results were compared with those observed in *S. frugiperda* reared on the artificial diet from Southland Products Inc., Lake Village, AK, which contains effective antimicrobials. Both diets were evaluated with and without the application of formaldehyde, sorbic acid, methyl paraben, sodium benzoate, potassium chloride and benomyl. In the diet BioServ without application of antimicrobials the larvae died because of the fungi contamination of diet. Benomyl and potassium chloride were toxic to early stages larvae. The larvae reared on untreated Southland diet showed longer life cycle, adult longevity and net reproductive rate (R_0). The innate capacity for increase (r_m) was significantly higher on this diet. The weight of third instars larvae and pupae were significantly lower when we applied sorbic acid and methyl paraben on the diet of BioServ. Regarding fertility, it

diminished in adults that emerged from diets with application of antimicrobials, which also affected the survival and reproduction of *S. frugiperda*. Although the fungi contamination of diet BioServ may be controlled with antimicrobials, this not a viable alternative to mass rearing *S. frugiperda* larvae.

Key words: contamination, artificial diets, fungi, control, antimicrobials, *S. frugiperda*, survival, reproduction.

2.1 INTRODUCCION

Las condiciones controladas bajo las cuales son utilizadas las dietas sintéticas, en la cría de masiva de insectos, propician el crecimiento de hongos sobre dicha fuente de alimento (Streett et al. 2008). Esto ocasiona la mortalidad de individuos a lo largo del ciclo de vida, principalmente en las etapas jóvenes. En otros casos, cuando estos llegan a la etapa adulta, se puede observar la emergencia de individuos con malformaciones, reducidos movimientos, afectaciones en la producción de feromona y en la cantidad de aminoácidos y ácidos grasos (Griffiths y Haskell 1988, Büyükgüzel y Yazgan 1999, Büyükgüzel 2001). Esta situación conlleva a interrupciones periódicas en los sistemas de cría de insectos (Sikorowski y Lawrence 1994, Sikorowski *et al.* 2001).

Para prevenir la contaminación de las dietas artificiales se han empleado diversos inhibidores de hongos (Xie et al. 1986, Griffiths y Haskell 1988, Grenier y Liu 1990). Entre los destacan el formaldehído y benzoato de sodio (Singh y House 1970a), ácido sórbico (Bell et al. 1981), benomil (Gifawesen et al. 1975, Bell et al. 1981) y metil paraben (Clark et al. 1961, Ouye 1962, Singh y House 1970b). Para ilustrar lo anterior, Singh y House (1970a) establecieron que de 58 dietas artificiales el 100 % de las mismas incluía entre sus componentes principales al metil paraben como inhibidor de hongos, un 72 % empleaba ácido sórbico y un 10 % contenía benzoato de sodio y formaldehído. Sin embargo, estos compuestos en altas concentraciones pueden ser tóxicos para los insectos, causando mortalidad (Sikorowski et al. 1984) y en otros casos afectan su desarrollo, supervivencia y reproducción (Singh y House 1970a). Por

otra parte, cuando se utilizan a concentraciones menores, estas no son efectivas para el control de los hongos presentes en la dieta (Büyükgüzel 2001).

Clark et al. (1961), Ouye (1962), y Power y Singh (1974) reportaron que el ácido sórbico y el metil paraben aplicados en altas concentraciones causaron un efecto tóxico sobre diversos insectos. El ciclo de vida del gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Noctuidae) fue lento cuando se incorporaron inhibidores a la dieta (Clark et al. 1961, Ouye 1962, Kishaba et al. 1968). Vail et al. (1968) señalan que el uso de metil paraben, ácido sórbico y formaldehído incrementó el período de desarrollo de larvas del gusano terciopelo *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Por otra parte, Büyükgüzel y Yazgan (2002) determinaron que el desarrollo de larvas de *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) fue normal cuando estas se alimentaron de una dieta que contenía inhibidores. De acuerdo con Singh y House (1970a) el efecto de los inhibidores de hongos depende del insecto a reproducir, por esta razón, es necesario determinar las concentraciones que no ocasionen efectos negativos sobre el ciclo biológico del insecto a criar y que logren controlar la diversidad de hongos que afectan a las dietas sintéticas (Büyükgüzel 2001).

Para analizar el impacto de un factor externo, sobre el crecimiento, la supervivencia, reproducción y el aumento de una población de insectos se utilizan las tablas de vida y fertilidad (Bellows et al. 1992). De esta manera es posible comparar poblaciones sujetas a distintas condiciones ambientales o evaluar diversas fuentes de alimento incorporadas a la dieta (Vera – Graziano 1989, Hansen et al. 1999). Las tablas de vida permiten conocer el ciclo de vida de un insecto, ya que describen la supervivencia de los individuos de una población según la edad de estos (Vera et al. 2002). Los

estadísticos más conocidos de esta clase de tablas son la esperanza media de vida (e_x), número de sobrevivientes al inicio del intervalo (n_x) y la proporción de sobrevivientes al inicio del intervalo (l_x). Estos dos últimos estadísticos se grafican con la finalidad de obtener las curvas de supervivencia que es la representación grafica de una tabla de vida en un sistema de coordenadas, en donde la n_x o l_x corresponde a las ordenadas y x (intervalo de edad en días) a las abscisas (Vera et al. 2002). Las tablas de fertilidad describen la fertilidad de las hembras de una población, según la edad de estas (Krebs 1978).

En el laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, la dieta BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. presentaba contaminación por hongos; en consecuencia se tenían problemas para utilizarla con diabroticas. Observaciones preliminares indicaban que dicha dieta se podría utilizar como alternativa para criar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith); sin embargo, la contaminación por hongos no lo permitía. Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto del formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio, aplicados a las dietas BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. y Southland Products Inc., Lake Village, AK., sobre la supervivencia, reproducción, peso de larvas de tercer instar y pupas de *S. frugiperda*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

Localización. La investigación se llevo a cabo en una cámara de cría perteneciente al laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

Dietas utilizadas. Se utilizaron dos dietas artificiales: Southland Products Inc., Lake Village, AK. y Rootworm, Bio-Serv Inc., Frenchtown, NJ., ambas con y sin aplicación de antimicrobiales.

Antimicrobiales. Se utilizó formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio benomil y cloruro de potasio a una concentración de 0.38, 2.5, 2.8, 3.0, 3.8 y 4.0 % (v:v), respectivamente.

Insectos. Las tasas de supervivencia y reproducción se estimaron en una raza de *S. frugiperda* la cual se ha reproducido en dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK., específica para esta especie, por más de 100 generaciones bajo condiciones de laboratorio.

Procedimiento experimental. Las dietas se prepararon, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, con la ayuda de un dispensador automático un mililitro de dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK se vertió en cada una de las 64 cavidades que constituyen la mitad de una charola para bioensayo (BAW - 128, C - D International, Pitman, NJ). La misma porción de dieta BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. se vertió en las 64 cavidades restantes. Una vez que las dietas solidificaron (a las 3 horas), se aplicaron 210.5 $\mu\text{L cm}^{-2}$ del antimicrobial respectivo en 32 cavidades de cada dieta. La misma cantidad de agua destilada estéril se aplicó como testigo en las 32 cavidades restantes de cada dieta. A las 24 h se depositó una larva neonata por

cavidad, se cubrieron con un plástico transparente autoadherible (BIO – CV - 16, C - D International) y se colocaron en cámara de cría a 27 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ humedad relativa y fotoperiodo de 12: 12 h luz: oscuridad, hasta que las larvas alcanzaran el tercer instar de desarrollo. Posteriormente se determinó el peso de las larvas y se transfirieron de manera individual en recipientes de plástico de 30 mL (Envases Cuevas S.A. de C. V., Ecatepec, Estado de México, México) con 8 mL de cada dieta y la concentración correspondiente de cada inhibidor de hongos. A los testigos sin tratar se les aplicó agua destilada. Los recipientes con larvas se llevaron a cámara de cría hasta que las larvas puparon, las cuales se pesaron a las 24 h después de llegar a ese estado de desarrollo. Las pupas se clasificaron por sexo con base en los caracteres morfológicos descritos por Sannino et al. (1987) y se colocaron en una relación 1:1 dentro de una jaula (25 X 25 X 35 cm) forrada con tela de organza donde emergieron los adultos y copularon. Tres a cinco días después, los adultos se transfirieron a bolsas de papel estraza N° 18 para obtener huevos que se contabilizaron diariamente. Para la alimentación de los adultos, espumas de poliéster se saturaron con una solución azucarada al 10 % y se depositaban en cajas petri de 8 cm de diámetro, las cuales se colocaron en el interior de las jaulas y bolsas de papel estraza, hasta la muerte del último espécimen.

Tablas de vida y fertilidad. Para estimar duración del ciclo biológico se utilizó la técnica demográfica de tablas de vida y fertilidad con base en el método descrito por Vera et al. (2002). Se realizaron observaciones cada 24 h, registrando duración de las etapas de larva, prepupa, pupas y adulto, así como número de sobrevivientes en cada una de estas fases de desarrollo. Por medio del programa Excel (Microsoft Excel[®],

2007) se calcularon los siguientes parámetros: esperanza media de vida (e_x), o unidades de tiempo que le quedan por vivir, en promedio, a cualquier individuo que haya cumplido cierta edad (Vera et al. 2002); proporción de sobrevivientes al inicio de cierta edad (l_x), función que fue graficada, en relación al tiempo, para obtener las curvas de supervivencia; tasa neta de reproducción (R_0), o número de hijas nacidas por cada hembra durante una generación (Birch, 1948); tiempo de generación (T) que es el tiempo promedio entre el nacimiento de los padres y los hijos (Badii et al. 2000); capacidad innata de incremento (r_m), que se expresa como el número de individuos por unidad de tiempo (Vera et al. 2002) y la tasa finita de incremento (λ), que es el tiempo promedio entre el nacimiento de los padres y los hijos (Badii et al. 2000).

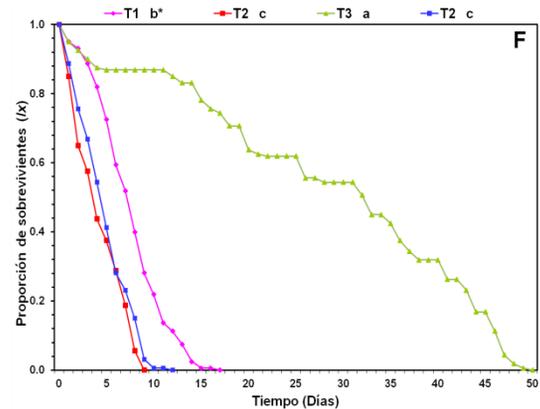
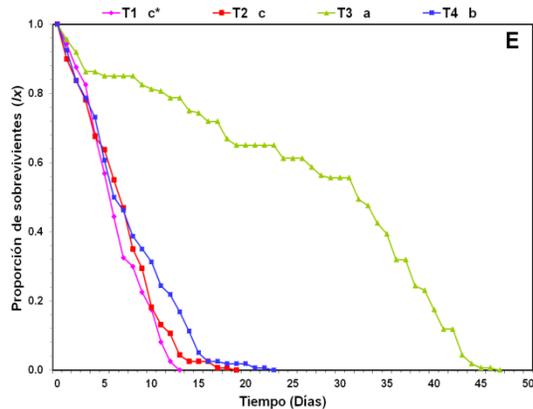
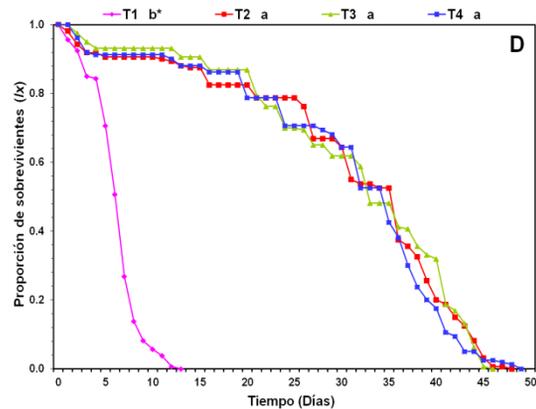
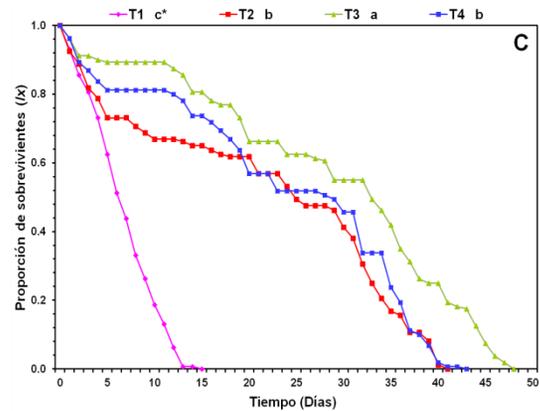
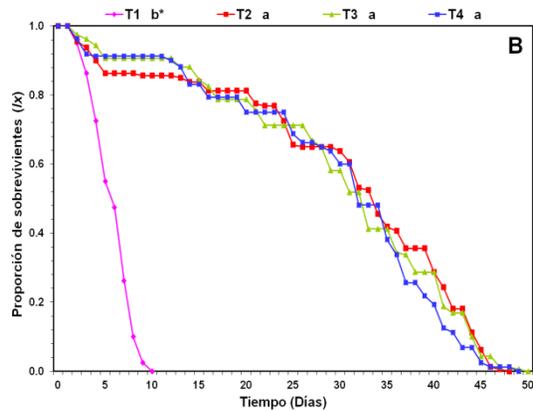
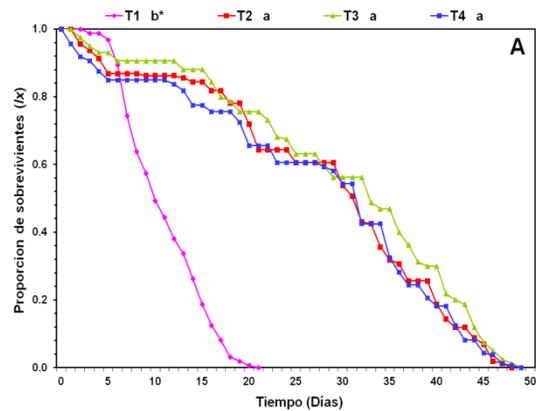
Análisis estadístico. Las curvas de supervivencia, para los tratamientos estudiados con cada uno de los antimicrobiales se compararon por pares mediante la prueba de Logrank ($\alpha = 0.05$) (Méndez et al. 2004). La capacidad innata de incremento (r_m) se comparó con la prueba de Traslape de Intervalos (Vera y Sotres, 1991). Para determinar el efecto de los inhibidores sobre el peso promedio de larvas en tercer instar y pupas, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis, seguida por la prueba de Bonferroni, utilizando el programa SAS ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

Tablas de vida. Con la proporción de sobrevivientes al inicio de cierta edad (l_x), se graficaron las curvas de supervivencia para cada tratamiento evaluado en cada uno de los antimicrobiales (Figura 1). Al comparar las curvas de supervivencia mediante la prueba de Logrank ($\alpha = 0.05$) se detectaron diferencias significativas.

En cada uno de los antimicrobiales evaluados, la dieta BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. sin aplicación de antimicrobiales fue la que expresó diferencias significativas ya que las larvas presentaron una supervivencia promedio de 20 días (Fig. 1A, B, C, D, E, F; T1) y solo se observaron larvas de primer y segundo instar de desarrollo (Cuadro 1A, B, C, D, E, F; T1). Lo anterior se debió a la contaminación por hongos que ocasionó la descomposición de la dieta y por ende provocó la mortalidad de larvas. Una situación similar documentaron Chacón *et al.* (2009) y Arévalo y Zenner de Polanía (2010) en una dieta para *S. frugiperda* y *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente. Bell *et al.* (1981) señalan que los hongos en dietas artificiales producen toxinas. Las larvas al alimentarse aumentan el ácido úrico en la hemolinfa y mueren (Sikorowski y Thompson 1984; Sikorowski *et al.* 1992). Entre los hongos que contaminan dietas artificiales se encuentran *Aspergillus* spp. (Bell *et al.* 1981; Proverbs *et al.* 1982; Arévalo y Zenner de Polanía 2010; Trivedy *et al.* 2011), *Neurospora* spp., *Rhizopus* spp., *Cladosporium* (Bell *et al.* 1981; Trivedy *et al.* 2011) y *Penicillium* spp. (Arévalo y Zenner de Polanía 2010). Lo anterior coincide con los hongos aislados e identificados molecularmente en el presente trabajo. Por otra parte, benomil y cloruro de potasio a 3.8 y 4.0 %, respectivamente, controlaron la contaminación, pero afectaron la supervivencia de larvas, la cual fue menor a 25 días

(Fig. 1E, F; T2, T4) sin la presencia de larvas en tercer. Así mismo, la duración del primer y segundo instar se prolongó a un lapso mayor de 10 días (Cuadro 1E, F; T2, T4). De acuerdo con Bass y Barnes (1969), y Singh y House (1970a) los antimicrobiales son tóxicos cuando se aplican en altas concentraciones. Bell *et al.* (1981) documentaron que el benomil, a dosis de 2 g gal⁻¹ en una dieta artificial empleada para la cría de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) y *H. virescens* fue efectivo para reducir la contaminación, sin embargo, ocasiono daños en el ciclo biológico. Cuando las dietas artificiales fueron tratadas con formaldehído, ácido sórbico y benzoato de sodio la supervivencia que se presentó en estos tratamientos no fue significativamente diferente a la que exhibieron los individuos de la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. (Fig. 1A, B, C, D). Cuando se aplicó metil paraben en las dietas Southland Products Inc., Lake Village, AK. y Rootworm, Bio-Serv Inc., Frenchtown, NJ. la sobrevivencia fue inferior y diferente a la que exhibieron los individuos de la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. sin aplicación de metil paraben. Kishaba *et al.* (1968) y Toba *et al.* (1969) establecen que los antimicrobiales pueden afectar el ciclo biológico de los insectos. En las dietas que se aplicaron con formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, y benzoato de sodio los especímenes de *S. frugiperda* prolongaron la duración de sus etapas biológicas, principalmente larva. Clark *et al.* (1961) y Ouye (1962) determinaron que la tasa de desarrollo de las larvas es uno de los principales parámetros para evaluar el impacto de los antimicrobiales. Así mismo, los adultos presentaron menor longevidad, la cual disminuyó en mayor proporción en aquellos que emergieron de las dietas con metil paraben (Cuadro 1A, B, C, D; T2, T4).



Curvas de supervivencia (lx) de *Spodoptera frugiperda* alimentado con dos dietas artificiales aplicadas con antimicrobiales. Formaldehído (A): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4); ácido sórbico (B): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.5 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.5 % (T4); metil paraben (C): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.8 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.8 % (T4); benzoato de sodio (D): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.0 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.0 % (T4); benomil (E): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.8 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.8 % (T4); cloruro de potasio (F): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.0 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.0 % (T4).

*Tratamientos con la misma letra en cada grafica no son significativamente diferentes (Logrank, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 1. Duración y traslapo (en días) de los estados biológicos de *Spodoptera frugiperda* en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales.

T [†]	Instar Larval						Pr	Pu	Ad
	1	2	3	4	5	6			
A: Formaldehido¹									
T1	17	14 – 21 [†]	-	-	-	-	-	-	-
T2	4	3 – 6	5 – 8	8 – 11	10 – 13	13 – 16	15 – 22	20 – 29	26 – 48
T3	3	3 – 5	4 – 7	7 – 9	9 – 11	11 – 14	13 – 19	17 – 27	24 – 49
T4	3	3 – 5	5 – 8	7 – 10	10 – 13	13 – 16	15 – 22	20 – 30	27 – 49
B: Ácido sórbico¹									
T1	10 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	4	3 – 6	6 – 9	9 – 12	11 – 14	14 – 17	16 – 24	21 – 31	28 – 48
T3	4	3 – 5	5 – 7	7 – 10	9 – 12	12 – 15	14 – 20	17 – 25	22 – 50
T4	4	3 – 6	6 – 9	9 – 12	12 – 15	14 – 17	16 – 23	21 – 30	28 – 49
C: Metil paraben¹									
T1	15 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	5	4 – 7	7 – 10	9 – 13	12 – 15	15 – 18	17 – 24	21 – 31	28 – 41
T3	3	3 – 5	5 – 7	8 – 10	10 – 12	12 – 15	14 – 21	18 – 27	25 – 48
T4	4	3 – 6	6 – 9	9 – 12	11 – 14	14 – 17	16 – 24	22 – 31	27 – 43
D: Benzoato de sodio¹									
T1	13 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	4	3 – 6	6 – 9	9 – 12	12 – 15	15 – 18	17 – 24	21 – 31	27 – 48
T3	3	3 – 5	4 – 7	7 – 10	9 – 12	12 – 15	14 – 22	20 – 28	25 – 46
T4	3	3 – 6	6 – 9	9 – 12	12 – 15	15 – 18	16 – 23	21 – 30	27 – 49
E: Benomil¹									
T1	13 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	13	9 – 19 [†]	-	-	-	-	-	-	-
T3	3	2 – 5	5 – 8	8 – 11	11 – 14	14 – 16	15 – 24	19 – 30	25 – 47
T4	15	12 – 23 [†]	-	-	-	-	-	-	-
F: Cloruro de potasio¹									
T1	17 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	9 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	3	3 – 5	5 – 8	7 – 11	10 – 13	13 – 16	15 – 24	20 – 31	26 – 50
T4	12 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-

[†] Antimicrobiales evaluados.

Pr = Prepupa, Pu = Pupa y Ad = Adulto.

[†] Todos los individuos murieron en esta etapa.

[†] T = Tratamientos: **A:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4). **B:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.50 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.50 % (T4). **C:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.80 % (T4). **D:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.00 % (T4); **E:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.80 % (T4); **F:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.00 % (T4).

De acuerdo con lo anterior, la longevidad de los adultos de *S. frugiperda* es afectada cuando se utiliza metil paraben. Davidson *et al.* (2000) reportaron que la eclosión de huevos y el desarrollo de las ninfas de mosca blanca *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae) fueron afectados cuando estas se desarrollaron sobre una dieta que contenía metil paraben. Clark *et al.* (1961) documentaron que el metil paraben ocasionó daños en *P. gossypiella* cuando se utilizó en altas concentraciones. Brazzel *et al.* (1961); Kishaba *et al.* (1968) y Bell *et al.* (1981) determinaron que el ácido sórbico, solo o en mezcla con metil paraben ocasiona efectos negativos a *H. zea* y *T. ni*. Larvas de *Copitarsia incommoda* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) redujeron su número de instares cuando se alimentaron de dieta con benzoato de sodio (Acatitla *et al.* 2004). El periodo de desarrollo de larvas de *T. ni* se prolongó cuando se alimentaron en una dieta con formaldehído (Vail *et al.* 1968).

El desarrollo de las larvas depende de la temperatura, calidad y tipo de alimento (Murúa *et al.* 2003; Arévalo y Zenner de Polanía 2009). En el presente experimento la temperatura no influyó sobre el crecimiento de *S. frugiperda*, ya que fue la misma para todos los tratamientos. Posiblemente las fuentes de proteína contenidas en cada dieta y la aplicación de formaldehído, ácido sórbico, metil paraben y benzoato de sodio ocasionaron estas diferencias. El germen de trigo y la harina de soya, son la principal fuente de proteína de dietas artificiales para lepidópteros (Blanco *et al.* 2009). La dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. es específica para *S. frugiperda* y está compuesta de germen de trigo, harina de soya, agar y conservadores, por lo cual al no ser tratada con antimicrobiales, favoreció el desarrollo de las larvas. Bass y Barnes (1969), Singh y House (1970) y Sikorowski *et al.* (1984) señalan que los antimicrobiales

a concentraciones altas pueden ser tóxicos y afectar el desarrollo, supervivencia y reproducción de insectos. Bell et al. (1981) determinaron que benomil controló la contaminación en una dieta para *H. zea* y *H. virescens*, sin embargo, afectó el ciclo biológico. Lo anterior indica que en *S. frugiperda*, *H. zea* y *H. virescens* benomil ocasiona efectos negativos. Por el contrario, la dieta BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. está fabricada con germen de trigo, caseína, y agar. Aun cuando la contaminación de esta dieta fue controlada con antimicrobiales, posiblemente contenía una menor cantidad de proteína que afectó el desarrollo de las larvas.

Los resultados de esperanza media de vida (e_x) indican que este parámetro fue inferior en la dieta BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. sin aplicación de antimicrobiales, debido a que ésta se contaminó, lo que ocasionó mortalidad en los estados juveniles de la larva (Cuadro 2A, B, C, D, E, F; T1). Cuando se utilizó cloruro de potasio (Cuadro 2F), la esperanza media de vida fue superior en larvas alimentadas con dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. que no fue tratada (Cuadro 2F; T3), en contraste con las dietas BioServ, Inc., Frenchtown, NJ. y Southland Products Inc., Lake Village, AK. aplicadas con cloruro de potasio (Cuadro 2F; T2, T4), debido a que las larvas neonatas no se adaptaron y murieron. Esta misma tendencia se observó al evaluar benomil (Cuadro 2E). Al aplicar metil paraben (Cuadro 2C), la esperanza media de vida fue mayor en la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. sin aplicación (Cuadro 2C; T3). Mientras que en las dietas BioServ Inc., Frenchtown, NJ. y Southland Products Inc., Lake Village, AK. que se aplicaron con metil paraben (Cuadro 2C; T2, T4) este parámetro fue similar, debido a que se observó una mortalidad homogénea entre estas dos dietas, principalmente en el desarrollo de larvas.

Cuadro 2. Esperanza media de vida (e_x)[†] de *Spodoptera frugiperda* criado en dos dietas artificiales tratadas con inhibidores de hongos.

Días (x)	Tratamientos [‡] (e_x)								Días (x)
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
	A: Formaldehído ¹				D: Benzoato de sodio ¹				
0	8.54	9.08	9.37	8.83	5.80	9.25	9.48	9.31	0
10	4.29	9.58	9.35	9.18	1.28	9.48	9.62	9.60	10
20	0.50	8.67	8.54	9.32	-	8.73	8.14	9.24	20
30	-	6.47	7.74	6.40	-	6.85	7.47	6.48	30
40	-	3.53	3.46	3.64	-	3.44	2.25	2.68	40
50	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	B: Ácido Sórbico ¹				E: Benomil ¹				
0	5.45	9.03	9.37	9.31	5.97	6.08	8.73	6.24	0
10	0.00	9.72	9.30	9.16	1.11	2.53	9.06	3.35	10
20	-	8.48	9.19	9.28	-	-	9.32	1.17	20
30	-	6.83	6.82	6.48	-	-	6.87	-	30
40	-	3.18	3.09	2.76	-	-	2.29	-	40
50	-	-	0.00	-	-	-	-	-	50
	C: Metil paraben ¹				F: Cloruro de potasio ¹				
0	6.09	7.84	9.10	8.53	6.72	3.92	8.93	4.48	0
10	1.60	9.64	9.02	8.96	2.16	-	9.01	1.50	10
20	-	8.27	9.42	9.22	-	-	9.24	-	20
30	-	4.79	7.36	5.30	-	-	7.66	-	30
40	-	0.50	3.73	1.17	-	-	4.50	-	40
50	-	-	-	-	-	-	0.00	-	50

[†] Por espacio, solo se presentan valores de cada diez días.

¹ Antimicrobiales evaluados.

[‡] Tratamientos: **A:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4). **B:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.50 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.50 % (T4). **C:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.80 % (T4). **D:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.00 % (T4); **E:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.80 % (T4); **F:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.00 % (T4).

Con respecto a las dietas Southland Products Inc., Lake Village, AK. con y sin aplicación de benzoato de sodio y BioServ Inc., Frenchtown, NJ. (Cuadro 2D; T2, T3, T4) tratada con el mismo inhibidor, la esperanza media de vida (e_x) fue semejante. La misma situación se presentó cuando las dietas fueron tratadas con formaldehído

(Cuadro 2A; T2, T3, T4) y ácido sórbico (Cuadro 2B; T2, T3, T4), debido a que la mortalidad fue homogénea durante el ciclo del insecto (Fig. 1A, B, D; T2, T3, T4).

Tablas de fertilidad. Con respecto a la tasa neta de reproducción (R_0), capacidad innata de incremento (r_m), tiempo de generación (T) y tasa finita de incremento (λ), en la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin aplicación de antimicrobiales (Cuadro 3A, B, C, D, E, F; T1) estos parámetros no se determinaron debido a que no se contó con adultos. La misma situación se presentó cuando las dietas se trataron con benomil y cloruro de potasio (Cuadro 3E, F; T2, T4) los cuales fueron tóxicos para larvas. Los valores más altos de R_0 , r_m , y λ se observaron en las larvas que se alimentaron con la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. sin aplicación de antimicrobiales (Cuadro 3A, B, C, D, E, F; T3), seguidas por las criadas con la misma dieta pero aplicada con formaldehído, ácido sórbico, metil paraben y benzoato de sodio (Cuadro 3A, B, C, D; T4) y finalmente por aquellas de la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. tratada con los antimicrobiales mencionados anteriormente (Cuadro 3A, B, C, D; T2). La tasa finita de incremento (λ) osciló entre 1.100 y 1.125 y fue superior en la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. que no fue aplicada (Cuadro 3A, B, C, D, E, F; T3). Lo anterior se debió, probablemente, a que esta dieta es específica para *S. frugiperda* y está compuesta de los requerimientos mínimos de proteínas, carbohidratos y vitaminas para el desarrollo y reproducción del insecto; caso contrario a la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. El tiempo de generación (T) de los individuos alimentados de dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. sin aplicación de antimicrobiales (Cuadro 3A, B, C, D, E, F; T3) y los de las dietas tratadas (Cuadro 3A, B, C, D; T2, T4) fue de 33 a 38 días; mientras que aquellos de la dieta Southland

Products Inc., Lake Village, AK. sin aplicación de antimicrobiales fueron los que presentaron el menor T y los valores más altos de R_0 . Lo anterior significa que el T no ayuda a definir la calidad de las dietas. La misma situación reportaron Acatitla et al. (2004) al observar que individuos de *C. incommoda* con mayor tasa neta de reproducción presentaron menor tiempo de generación. Blanco et al. (2009) evaluaron diferentes porcentajes de proteína incorporados a una dieta para *H. virescens*. Los resultados indicaron que las larvas no se desarrollaron en dietas que contenían únicamente germen de trigo y las que llegaron al estado adulto no produjeron descendencia. Así mismo, observaron menor tasa neta de reproducción, tiempo de generación, proporción de sobrevivencia y longevidad de adultos. House (1965) menciona que la deficiencia de proteínas y carbohidratos conlleva a una menor reproducción y ocasiona pérdida de vitalidad general. Posiblemente, al aplicar los antimicrobiales en la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. las larvas disminuyeron su alimentación, debido a ello, los estadísticos vitales fueron menores. Por otra parte, la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ., probablemente contenía bajos niveles de proteína, carbohidratos o vitaminas que en combinación con los antimicrobiales redujeron la tasa neta de reproducción (R_0), tasa finita de incremento (λ) y capacidad innata de incremento (r_m) de *S. frugiperda*. Con respecto a la capacidad innata de incremento (r_m), esta se comparó con la prueba de traslape de intervalos (Vera y Sotres 1991), y se estableció que si existía traslape después de 16 días, las r_m a comparar no se considerarían significativamente diferentes (Cuadro 4).

Cuadro 3. Estadísticos vitales de *Spodoptera frugiperda* criado en dos dietas artificiales tratadas con inhibidores de hongos.

Tratamientos [†]		R_o	r_m	T	Λ
		Formaldehído ¹			
A	T1 [†]	-	-	-	-
	T2	18.54	0.083	35.04	1.087
	T3	40.63	0.111	33.52	1.117
	T4	30.40	0.096	35.59	1.101
		Acido sórbico ¹			
B	T1 [†]	-	-	-	-
	T2	29.55	0.089	38.21	1.093
	T3	47.63	0.118	32.86	1.125
	T4	39.86	0.097	38.10	1.102
		Metil paraben ¹			
C	T1 [†]	-	-	-	-
	T2	6.46	0.055	33.66	1.057
	T3	32.02	0.101	34.27	1.106
	T4	13.79	0.077	34.15	1.080
		Benzoato de sodio ¹			
D	T1 [†]	-	-	-	-
	T2	18.93	0.082	36.08	1.085
	T3	21.82	0.092	33.49	1.096
	T4	24.15	0.091	35.17	1.095
		Benomil ¹			
E	T1 [†]	-	-	-	-
	T2 [†]	-	-	-	-
	T3	45.65	0.111	34.36	1.118
	T4 [†]	-	-	-	-
		Cloruro de potasio ¹			
F	T1 [†]	-	-	-	-
	T2 [†]	-	-	-	-
	T3	29.25	0.092	36.68	1.096
	T4 [†]	-	-	-	-

[†] Todos los individuos murieron antes del tercer instar.

¹ Inhibidores de hongos evaluados.

R_o = tasa neta de reproducción, r_m = capacidad innata de incremento, T = tiempo de generación y λ = tasa finita de incremento.

[†] Tratamientos: **A:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4). **B:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.50 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.50 % (T4). **C:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.80 % (T4). **D:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.00 % (T4); **E:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.80 % (T4); **F:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.00 % (T4).

Cuadro 4. Límites de confianza[¶] de la r_m de *Spodoptera frugiperda* criado en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales, según prueba de Traslado de Intervalos.

t (días)	dieta BioServ con aplicación del inhibidor			dieta Southland sin aplicación del inhibidor			dieta Southland con aplicación del inhibidor		
	n [†]	Límites de confianza		N	Límites de confianza		N	Límites de confianza	
		Superior	Inferior		Superior	Inferior		Superior	Inferior
13	344	344	244	A: Formaldehído*					
26				423	501	345			
32	1424	1710	1138	2238	2700	1776	1470	1768	1173
							2159	2600	1717
13	318	373	263	B: Acido sórbico*					
20				464	551	377			
-	-	-	-	1059	1273	846	696	831	561
							-	-	-
6	139	154	124	C: Metil paraben*					
16				183	157	209			
32	241	279	203	503	598	409	343	403	283
							343	403	283
42	3131	3773	2490	D: Benzoato de sodio*					
-				4766	3779	5752			
47	4718	5690	3746	-	-	-	-	-	-
				7202	8698	5706			

[¶]Para fijar estos límites de confianza se fijó $k=2$, lo cual da una probabilidad del 75 %.

[†] n_0 se fijó para todos los casos igual a 100.

* Antimicrobiales evaluados.

- Existió traslapo de intervalos entre ambos tratamientos durante todo el ciclo de vida del insecto.

Los valores de r_m obtenidos en dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. aplicada con antimicrobiales fueron menores y diferentes a los de la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. que no fue tratada. Lo anterior indica que la población se incrementó cuando las larvas se alimentaban de esta última dieta. Por lo cual, aun controlando la contaminación de la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ., ésta no favorece la reproducción de *S. frugiperda*. Cuando se aplicó benzoato de sodio, no se observaron diferencias significativas, posiblemente a la cantidad de huevos depositados la cual fue similar entre los adultos que emergieron de las dietas con y sin aplicación de este antimicrobial (Fig. 2D).

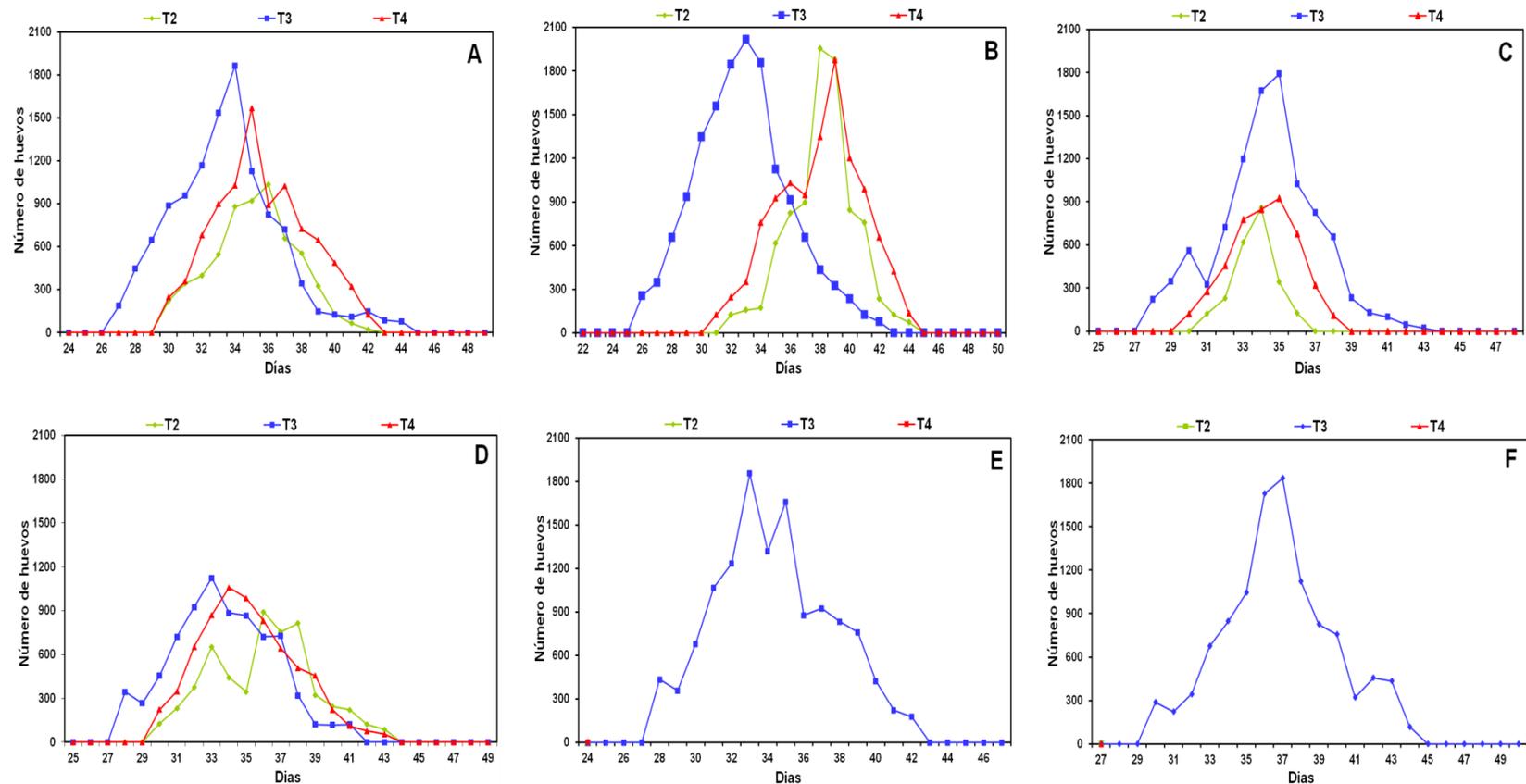


Figura 2. Fertilidad de *Spodoptera frugiperda* alimentado con dos dietas artificiales aplicadas con antimicrobiales. Formaldehído (A): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4); ácido sórbico (B): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.5 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.5 % (T4); metil paraben (C): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.8 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.8 % (T4); benzoato de sodio (D): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.0 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.0 % (T4); benomil (E): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.8 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.8 % (T4); cloruro de potasio (F): dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.0 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.0 % (T4).

*Tratamientos con la misma letra en cada grafica no son significativamente diferentes (Logrank, $\alpha = 0.05$).

Las dietas BioServ Inc., Frenchtown, NJ. y Southland Products Inc., Lake Village, AK. con aplicación de antimicrobiales no fueron significativamente diferentes entre sí. Lo anterior puede deberse a que la preferencia alimenticia de las larvas fue similar lo cual ocasiono que estas acumularan nutrientes en la misma proporción. Patton (1963) y House (1965) señalan que la nutrición es esencial en los estados inmaduros de los insectos y es reflejada durante la etapa adulta. La fertilidad de adultos de *S. frugiperda* que emergieron de dietas con y sin aplicación de benzoato de sodio fue similar (Figura 2D), ya que la cantidad de huevos depositados fue semejante. Las larvas que se alimentaron de BioServ Inc., Frenchtown, NJ. sin aplicación de antimicrobiales, y de Southland Products Inc., Lake Village, AK. y BioServ Inc., Frenchtown, NJ. aplicadas con benomil y cloruro de potasio murieron antes del tercer instar (Cuadro 1E, F; T1, T2, T3). Por lo cual solo se observó presencia de huevos en la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. que no fue aplicada (Fig. 2E, F; T3). Los componentes de la dieta Southland Products Inc., Lake Village, AK. favorecieron la fertilidad, ya que la dieta se encuentra fabricada con germen de trigo y harina de soya. House (1965) señala que la harina de soya y el germen de trigo, son importantes para producción de huevos. Villacorta y Barrera (1996) y Blanco et al. (2009) afirman que una deficiencia nutricional o bajo nivel de proteína disminuyen la fertilidad en insectos.

Peso de larvas y pupas. El peso de larvas en tercer instar y pupas se indica en el Cuadro 3. Según Bustillo (1979) el peso de larvas y pupas pueden indicar la calidad de las dietas. En larvas de tercer instar el peso fluctuó entre 24 a 26 mg y fue similar en los tratamientos evaluados, excepto en la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. aplicada con ácido sórbico ya que las larvas presentaron un peso significativamente inferior. El

peso de pupas osciló entre 220 a 270 mg, siendo significativamente diferente cuando se aplicó ácido sórbico y metil paraben en la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. ya que las pupas exhibieron un peso menor.

Cuadro 5. Peso promedio (mg) de larvas de tercer instar y pupas de *Spodoptera frugiperda* en dos dietas artificiales tratadas con antimicrobiales.

Tratamientos [¶]	Larvas en tercer instar	Pupas	Larvas en tercer instar	Peso de pupas	Tratamientos [¶]
A: Formaldehído¹			D: Benzoato de sodio¹		
T1	*	*	*	*	T1
T2	24.1 a†	251.0 a	23.9 a	225.0 a	T2
T3	24.3 a	260.7 a	24.0 a	234.7 a	T3
T4	24.0 a	229.1 a	24.7 a	229.1 a	T4
x ²	1.10	2.94	0.29	3.38	x ²
Pr > F	0.71	0.35	0.59	0.22	Pr > F
B: Acido sorbico¹			E: Benomil¹		
T1	*	*	*	*	T1
T2	24.0 b	246.7 b	*	*	T2
T3	25.6 a	267.6 a	24.5	252.9	T3
T4	24.8 a b	257.6 a b	*	*	T4
x ²	5.94	11.33	-	-	x ²
Pr > F	0.03	0.002	-	-	Pr > F
C: Metil paraben¹			F: Cloruro de potasio¹		
T1	*	*	*	*	T1
T2	24.1 a	227.9 b	*	*	T2
T3	24.5 a	245.5 a	24.8	254.3	T3
T4	24.1 a	230.3 b	*	*	T4
x ²	0.31	9.78	-	-	x ²
Pr > F	0.62	0.0002	-	-	Pr > F

* Sin registro de peso, ya que todos las larvas murieron antes del tercer instar.

¹ Antimicrobiales evaluados.

† Tratamientos con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes.

- No se realizó análisis de varianza ni prueba de comparación de medias.

[¶] Tratamientos: **A:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + formaldehído al 0.38 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + formaldehído al 0.38 % (T4). **B:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + ácido sórbico al 2.50 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + ácido sórbico al 2.50 % (T4). **C:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + metil paraben al 2.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + metil paraben al 2.80 % (T4). **D:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benzoato de sodio al 3.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benzoato de sodio al 3.00 % (T4); **E:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + benomil al 3.80 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + benomil al 3.80 % (T4); **F:** dieta BioServ (T1), dieta BioServ + cloruro de potasio al 4.00 % (T2), dieta Southland (T3) y dieta Southland + cloruro de potasio al 4.00 % (T4).

Con base en lo anterior, las larvas al alimentarse de la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. tratada con ácido sórbico o metil paraben reducen significativamente su alimentación. Moore (1986) señala que las larvas disminuyen su preferencia alimentaria cuando los componentes de la dieta son diferentes, lo cual afecta su desarrollo. Por tanto, las dietas artificiales deben estar compuestas de elementos básicos, en proporciones adecuadas, para un buen desarrollo de los insectos. En el experimento, el peso fue un factor relacionado a supervivencia y fertilidad, ya que larvas y pupas con mayor peso exhibieron una supervivencia y fertilidad superior. Arévalo y Zenner de Polanía (2009) indican que individuos con mayor peso presentan una mejor supervivencia. Acatitla et al. (2004) documentaron que el peso de pupas tienen relación con la fertilidad de los adultos, ya que pupas de *C. incommoda* con un mayor peso produjeron adultos más fértiles.

2.4 CONCLUSIONES

La contaminación de la dieta BioServ Inc., Frenchtown, NJ. con hongos afectó la supervivencia de *S. frugiperda*. El benomil y cloruro de potasio fueron tóxicos para las larvas en los primeros estadios. En las dietas artificiales aplicadas con formaldehído, ácido sórbico, metil paraben y benzoato de sodio *S. frugiperda* prolongó el desarrollo de cada etapa de su ciclo biológico. Así mismo, los adultos presentaron una menor longevidad, tasa neta de reproducción (R_0), capacidad innata de incremento (r_m), tiempo de generación (T), y tasa finita de incremento (λ) y las hembras menor fertilidad.

2.5 LITERATURA CITADA

- Acatitla, T. C., Bautista, M. N., Vera, G. J. Romero, N. J. y Calyecac, C. H. G. 2004. Ciclo biológico y tasa de supervivencia y reproducción de *Copitarsia incommoda* Walker (Lepidóptera: Noctuidae) en cinco dietas artificiales. *Agrociencia*: 38: 355 – 363.
- Alverson, J. y Cohen, C. A. 2002. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.* 95: 256 – 260.
- Arévalo, M. H. y Zenner de Polanía, I. 2009. Evaluation of meridic diets for rearing *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) under laboratorio conditions. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 12: 79 – 90.
- Badii, H. M., A. E. Flores y L. A. Rodríguez del Bosque. 2000. Tablas de vida, pp. 155 – 177. *En* M. H. Badii, A. E. Flores y L. J. Galan W. (eds). *Fundamentos y perspectivas del control biológico*. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Bass, M. H. y E. E. Barnes. 1969. Toxicities of antimicrobial agents to white – fringed beetle larvae and the effectiveness of certain of these agents against microbial growth. *J. Econ. Entomol.* 62: 718 – 719.
- Bell, J. V., King, G. E. y Hamalle, J. R. 1981. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis* spp. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 243 – 248.
- Bellows, T.S., Driesche van, R. G., Elkinton, J. S. 1992. Life table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 587–614.
- Blanco, C. A., Portilla, M., Abel, C. A., Winters, H., Ford, R. y Streett, D. 2009. Soybean flour and wheat germ proportions in artificial diet and their effect on the growth rates of the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *J. Insect. Sci.* 9:59.
- Brazzel, J. R., Chambers, H. y Hamman, P. J. 1961. A laboratory rearing method and dosage – mortality data on the bollworm, *Heliothis zea*. *J. Econ. Entomol.* 54: 949 – 952.
- Bustillo, A. E. 1979. La nutrición en insectos. Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín, Colombia. Boletín de Divulgación. Número 2. 43 p.
- Büyükgüzel, K. y Yazgan, S. 2002. Effects of Antimicrobial Agents on the Survival and Development of Larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Reared on an Artificial Diet. *Turk. J. Zool.* 26: 111 – 119.
- Büyükgüzel, K. 2001. Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 94 (1): 21 – 26.
- Büyükgüzel, K. y Yazgan, S. 1999. Combinational effects of some antimicrobials agents on the survival and development of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Ser. C.* 48: 1 – 14.

- Chacón, C. Y., Garita, R. C., Vaglio, C. C. y Villalba, V. V. 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en Marcha* 22: 28-37.
- Clark, E. W., Richmond, C. A. y McGough, J. M. 1961. Artificial media and rearing techniques for the pink bollworm. *J. Econ. Entomol.* 54: 4 – 9.
- Davidson, E. W., Fay, M. L., Blackmer, J. y Lavine, M. 2000. Improved Artificial Feeding System for Rearing the Whitefly *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). *Fla. Entomol.* 83: 459 – 468.
- Gifawesen, C., B. R. Funke y F. I. Proshold. 1975. Control of antifungal – resistant strain of *Aspergillus niger* mold contaminants in insect rearing media. *J. Econ. Entomol.* 68: 441 – 444.
- Grenier, S. y W. H. Liu. 1990. Antifungals: mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Entomophaga* 35: 283 - 291.
- Griffiths, J. S. R. y Haskell, P. T. 1988. Culture of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) using novel group rearing techniques and a semi – artificial diet. *Trop. Pest. Man.* 34: 349 – 355.
- Hansen, D. L., Brodsgaard, H.F. y Enkegaard, A. 1999. Life table characteristics of *Macrolophus caliginosus* preying upon *Tetranychus urticae*. *Entomol Exp Appl* 9:269–275.
- House, L. H. Insect nutrition. In: *The Physiology of insecta*, volume II. Edited by Rockstein, M. Academic Press. New York. pp 769 – 813.
- Hedin, P.A., A. C. Thompson, R. C. Gueldner y R. D. Henson. 1974. Analysis of the antimicrobial agents, potassium sorbate and methyl – *p* – hydroxybenzoate, in boll weevil diets. *J. Econ. Entomol.* 67: 147 – 149.
- Kishaba, A. N., Henneberry, T. J., Pangaldan, R. y Tsao, P. H. 1968. Effects of mold inhibitors in larval diet on the biology of the cabbage looper. *J. Econ. Entomol.* 61: 1189 – 1194.
- Krebs, J. C. 1978. *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance.* Second Edition. Harper & Row, Publishers. New York, Evanston, San Francisco, London.
- MacGown, M. W. y Sikorowski, P. P. 1980. Histopathology of midgut of mass reared, irradiated boll weevils contaminated with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp. *J. Econ. Entomol.* 73: 81 – 87.
- Méndez, R. I., G. D. Namihira, A. L. Moreno y C. Sosa. 2004. El protocolo de Investigación. Editorial Trillas. 9ª reimpresión. 210 p.
- Moore, R. F. 1986. Feeding preferences and utilization studies as tools in developing an optimum diet for *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 1707-1710.

- Murúa, M. G., Virla, E. G. y Defagó, V. 2003. Evaluación de cuatro dietas para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas 29: 43 – 51.
- Ouye, M. T. 1962. Effects of antimicrobial agents on microorganisms and pink bollworm development. J. Econ. Entomol. 55: 854 – 857.
- Patton, R. L. 1963. Introductory insect physiology. W. E. Saunders Company. Philadelphia. pp 7 – 29.
- Power, R. J. B. y Singh, P. 1974. Laboratory rearing method for the stem weevil *Hyperodes bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae). New Zealand J. Zool. 1: 531 – 536.
- Sannino, L. Balbiani, A. y Espinosa, B. 1987. Osservazioni morfobiologiche su alcune specie del genere *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) e rapporti di parasitismo con la coltura del tabacco in Italia. Inf. Fitopatol. 11: 29 – 40.
- SAS. 2002. Statistical Analysis System SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sikorowski, P. P. y Thompson, A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comp. Biochem. Physiol. 77: 283 – 285.
- Sikorowski, P. P., G. R. Burkett, A. C. Thompson y A. D. Kent. 1984. Effects of antimicrobials on development of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Ga. Entomol. Soc. 19: 327 – 332.
- Sikorowski, P. P., Powell, J. E. y Lawrence, A. M. 1992. Effects of bacterial contamination on development of *Microplitis croceipes* (Hym: Braconidae). Entomophaga 37: 475 – 481.
- Sikorowski, P. P. y Lawrence, A. M. 1994. Microbial contamination and insect rearing. Am. Entomol. 40: 240 - 253.
- Sikorowski, P. P., Inglis, G. D. y Lawrence, A. M. 2001. Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). Am. Entomol. 47: 51 – 60.
- Singh, P. 1976. Artificial Diets for Insects, Mites and Spiders. Entomology Division. Department of Scientific An Industrial Research. Auckland, New Zealand. pp 1 – 25.
- Singh, P. y House, H. L. 1970a. Antimicrobials: “safe” levels in a synthetic diet of an insect *Agria affinis*. J. Insect Physiol. 16: 1769 – 1782.
- Singh, P. y House, H. L. 1970b. Antimicrobials agents: their detrimental effects on size of an insect *Agria affinis*. Can. Entomol. 16: 1769 – 1782.
- Streett, D. A; Ni., X. y Lawrence, A. M. 2008. Effect of DNA gyrase inhibitors in the NI diet on Biological fitness of the western tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). J. Entomol. Sci. 43 (1): 86 – 94.

- Toba, H. H., A. N. Kishaba, R. Pangaldan y S. Riggs. 1969. Laboratory rearing of pepper weevils on artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 62: 257 – 258.
- Vail, P. V., Henneberry, T. J., Kishaba, A. N. y Arakawa, K. W. 1968. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents nuclear – polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.* 10: 84 – 93.
- Vélez, R. A. 1985. Notas sinópticas de entomología económica colombiana. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. pp. 145-149.
- Vera – Graziano. 1989. Temas selectos sobre ecología de poblaciones de insectos. 2ª edición. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 184 p.
- Vera, G. J. y D. Sotres. 1991. Prueba de traslape de intervalos para comparar tasas instantáneas de desarrollo poblacional. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal.* 2: 7 – 13.
- Vera, G. J., Pinto, V. M., López, C. J. y Reyna, R. R. 2002. *Ecología de Poblaciones de Insectos.* 2ª Edición. Colegio de Postgraduados. México. 137 p.
- Villacorta, A. y Barrera, J. F. 1996. Techniques for rearing of the parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae) on *Hyphotenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) using an artificial dieta. *Vedalia* 3: 45 – 48.
- Wiygul, G. y Sikorowski, P. P. 1986. The effect of staphylococcal enterotoxin B on pheromone production in fat bodies isolated from male boll weevils. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 116 – 119.
- Xie, Z. N., C. W. Nettles Jr., R. K. Morrison, K. Irie y S. B. Vinson. 1986. Three methods for the *in vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. *J. Entomol. Sci.* 21: 133 - 138.
- Zenner de Polanía, I., Arévalo, H. M. y Mejía, C. R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Rev. Col. Cienc. Hortícolas.* 1: 103-113.

CONCLUSIONES GENERALES

- Con base en el análisis molecular que se realizó a los aislamientos provenientes de la dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ., se concluyó que las especies de hongos que contaminan la dieta artificial son *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Neurospora tetrasperma*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Paecilomyces* spp.
- La contaminación de la dieta fue controlada con el uso de formaldehído, ácido sórbico, metil paraben, benzoato de sodio, benomil y cloruro de potasio a una concentración de 0.38, 2.5, 3.0, 2.8, 3.8 y 4.0 %, respectivamente.
- Las larvas de *S. frugiperda* no se desarrollaron en la dieta contaminada y murieron, mientras que el benomil y cloruro de potasio fueron tóxicos para las larvas en los primeros estadios.
- *S. frugiperda* prolongó el desarrollo de las etapas de su ciclo biológico en dietas artificiales tratadas con formaldehído, ácido sórbico, metil paraben y benzoato de sodio. Por otra parte, los adultos presentaron una menor longevidad, tasa neta de reproducción (R_0), capacidad innata de incremento (r_m), tiempo de generación (T), y tasa finita de incremento (λ), así mismo, las hembras exhibieron una menor fertilidad.
- El peso de larvas de tercer instar y pupas fue menor en dietas que contenían ácido sórbico y metil paraben. Las larvas de tercer instar y pupas con mayor peso presentaron una supervivencia y reproducción superior.
- La dieta artificial BioServ Inc., Frenchtown, NJ. no puede ser utilizada como una alternativa para la cría masiva de *S. frugiperda* a pesar de que se utilicen antimicrobiales para contrarrestar la contaminación.