

Procedimientos para establecer y mantener una cría del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en condiciones de laboratorio

Procedures for Establishing and Maintaining a Brood of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) under Laboratory Conditions

María de la Luz Sierra-Ruíz¹ orcid.org/0000-0001-5617-9925
Yolanda M. García-Rodríguez¹ orcid.org/0000-0002-8989-1836
Rafael Torres-Martínez¹ orcid.org/0000-0001-7744-5129
Guillermo Delgado-Lamas² orcid.org/0000-0002-1394-6300
Francisco J. Espinosa-García^{1*} orcid.org/0000-0001-9173-1957

¹Laboratorio de Ecología Química y Agroecología, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia.
²Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor de correspondencia. espinosa@cicco.unam.mx

Resumen

Objetivo. Presentar un procedimiento de bajo costo para la cría y mantenimiento de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio para obtener material biológico óptimo para fines de investigación. **Materiales y métodos.** Estos procedimientos se basan en el documento del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) “Técnicas eficientes para la crianza masiva e infestación de insectos en la selección de plantas hospedantes para resistencia al gusano cogollero”, nuestra experiencia en la cría del gusano, y en la literatura publicada. **Resultados.** Se describen los procedimientos para la colecta en campo del pie de cría y las medidas de cuidado para la cría en cada fase

Abstract

Objective. Present a low-cost procedure for the rearing and maintaining *S. frugiperda* in laboratory conditions to obtain optimal biological material for research. **Material and methods.** Those procedures are based on the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) document “Efficient techniques for mass rearing and insect infestation in host plant selection for resistance to the fall armyworm”, our experience in rearing the fall armyworm, and the literature cited. **Results.** The procedures for field collection of brood stock and care measures for brood rearing at each stage of the life cycle of the fall armyworm *S. frugiperda* were described. In several cases,

del ciclo biológico del gusano cogollero *S. frugiperda*. En varios casos se ajustaron o mejoraron los métodos publicados, también se comentan varios problemas que se presentan en la cría y la manera de evitarlos; además, se incluye el procedimiento para regular la densidad de la población de la cría y las técnicas utilizadas para obtener larvas en tercer estadio, el cual normalmente se utiliza en los trabajos de investigación por ser la etapa óptima para el control de daños en los cultivos ocasionados por este insecto. Con los procedimientos presentados se puede obtener 85% de supervivencia a la etapa adulta. Conclusión. Se cumplió el objetivo.

Palabras clave

Larvas, dieta artificial, instares larvarios, densidad poblacional.

published methods were adjusted or improved; several problems encountered in rearing and how to avoid them were discussed. In addition, the procedure to regulate the population density of the brood and the techniques used to obtain third-instar larvae (usually used in research because it is the optimal stage for controlling crop damage caused by this insect) were included. With the procedures presented, 85% survival to the adult stage can be obtained. Conclusion. The objective was fulfilled.

Keywords

Larvae, insect rearing, artificial diet, larval instars, population density.

Introducción

La cría de insectos tiene el propósito de reproducir organismos para realizar estudios en condiciones controladas que permiten entender el comportamiento de los insectos, su biología, sus requerimientos nutricionales y usarlos como modelo de estudio para probar hipótesis de investigación ecológica. Actualmente, existe gran variedad de insectos producidos de forma masiva en condiciones de laboratorio con fines de investigación ecológica, agrícola o relacionada con la salud (Hoffmann y Ross, 2018).

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, es un insecto del orden Lepidoptera que presenta generalmente seis estadios larvales, etapa en la cual produce daños severos en los cultivos de interés agrícola, principalmente el maíz, debido a que se alimenta de hojas y tallos tiernos. Su capacidad de formar grandes poblaciones y su alta tasa de diseminación, convierten a esta especie en una plaga de impacto económico (Jing *et al.*, 2021; Sarkar *et al.*, 2021). Por esta razón es objeto de numerosas investigaciones y sus poblaciones se mantienen en condiciones de laboratorio para realizar estudios sobre sus enemigos naturales, sus mecanismos de resistencia a nuevas moléculas insecticidas y su respuesta a cultivos modificados con biotecnología, entre otros (Luna-López, 2013).

S. frugiperda es un lepidóptero reconocido como una de las plagas de polillas noctuidas más importantes. La especie se originó en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, se diseminó rápidamente e invadió casi 100 países en todo el mundo (Baloch *et al.*, 2020; Jing *et al.*, 2021).

Dependiendo de las temperaturas, su ciclo completo puede durar entre 30 y 55 días; es más corto en condiciones de mayor temperatura y viceversa. Para completar su ciclo de vida, los insectos realizan cambios de instar o estadio en cada etapa de su desarrollo. En

cada generación, el ciclo de la plaga está dividido en seis estadios (figura 1); la duración de estos varía (Jing *et al.*, 2021).



- Pupa: esta etapa dura entre 8-13 días. Miden de 14 a 17 mm de longitud y tienen estados de desarrollo en los cuales se aprecia cambio de color; cuando está próxima a emerger oscurece considerablemente (Luna-López, 2013).
- Adulto o palomillas: esta etapa dura entre 6 a 21 días. Los adultos presentan dimorfismo sexual, donde las hembras son de color pardo y sus alas anteriores no presentan manchas violáceas, que caracterizan al macho; además, la hembra es de mayor tamaño que el macho (Soto-Alcalá, 2008).
- Huevecillos: esta etapa dura entre 2-3 días. Miden 0.5 mm de diámetro, son color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima hacia la eclosión (García-Nevárez y Tarango-Rivero, 2009).
- Larvas: esta etapa dura de 17 a 32 días y pasan por 6 a 7 estadios. Presentan una coloración desde verde castaño a verde oliva, hasta casi negras a medida que se desarrollan; en el máximo desarrollo alcanzan entre 35 a 40 mm de longitud (Luna-López, 2013).

S. frugiperda es un insecto plaga de al menos 80 especies de cultivos, que puede ocasionar pérdidas significativas en el rendimiento de cultivos importantes como el maíz (FAO, 2017). En una revisión reciente de las plantas hospederas de *S. frugiperda* se identificó que las larvas tienen el potencial de consumir 353 especies de plantas pertenecientes a 76 familias botánicas, incluyendo cultivos, malezas, plantas ornamentales y plántulas en viveros (Montezano *et al.*, 2018).

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia Poaceae, es uno de los cultivos de cereales importantes en el mundo, sin embargo, las diferentes plagas causan pérdidas sustanciales en la cosecha a nivel mundial. La infestación severa de *S. frugiperda* causó pérdidas en cultivos de maíz de 22-67% en varios países debido a la pérdida de área foliar y retraso o inhibición en la emisión de las inflorescencias (Ramzan *et al.*, 2021). En Estados Unidos, las pérdidas causadas por esta plaga se estimaron en 300 millones de dólares anuales; sin embargo, en el continente africano las pérdidas económicas potenciales causadas por el gusano cogollero no controlado alcanzan hasta los 6 187 millones de dólares anuales (CABI, 2017; Montezano *et al.*, 2018).

Con base en lo anteriormente mencionado, la cría y el mantenimiento de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio es una actividad que requiere conocimiento del manejo de las diferentes etapas del ciclo biológico del insecto y ambientales necesarias para su establecimiento y desarrollo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es presentar un procedimiento de bajo costo para la cría y mantenimiento de *S. frugiperda* para obtener material biológico óptimo para fines de investigación.

Materiales y métodos

Este documento está basado en los conocimientos adquiridos durante la experiencia de mantener la cría de este insecto en el Laboratorio de Ecología Química y Agroecología, en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como en la bibliografía consultada para realizar dicho mantenimiento.

Establecimiento de la cría

El desarrollo óptimo de *S. frugiperda* en laboratorio está correlacionado por condiciones ambientales como la temperatura, humedad y el fotoperiodo. El ciclo de vida se acorta cuando la temperatura promedio es de 28 °C y se alarga cuando disminuye a los 21 °C (Chacón-Castro *et al.*, 2009).

La cría se estableció tomando en cuenta lo reportado por Chacón-Castro *et al.* (2009), así como las adecuaciones necesarias en las condiciones del área de trabajo. De inicio, se utilizó un cuarto de cultivo con temperatura constante y no menor de 19 °C. También fue necesario mantener la cría en una cámara de crecimiento en donde es más sencillo y seguro el control de la temperatura para su desarrollo. Esta cámara se programó a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 12 horas luz, condiciones que resultan favorables para el desarrollo del insecto durante el ciclo de vida, que bajo estas condiciones puede oscilar entre 30 y 35 días.

El cuarto de cultivo requirió de anaqueles, mesas y un área de lavado para el trabajo de mantenimiento de la cría, esto es para el acomodo del material y mantener su higiene. El mantenimiento de la cría (1 500-2 000 larvas aproximadamente) se realizó en un espacio de 2.5 x 3.0 m. El tamaño de este cuarto de cultivo puede variar con relación a la cantidad del material utilizado y la densidad poblacional de la cría, que permita una fácil manipulación y uso del material para el mantenimiento de la cría.

El material que se utilizó para realizar la colecta en campo y el mantenimiento de la cría de *S. frugiperda* se enlista a continuación: miel natural, toallas de papel, paño de esponja cortado en pequeños pedazos de 5 x 1 cm, cajas de plástico herméticas de 25 cm de largo x 15 cm de ancho y 5 cm de altura, pinzas entomológicas, agujas entomológicas, pinceles suaves, bolsa grande de papel de estraza (tamaño No. 16), bolsas de polipapel (30 x 25 cm), costales o bolsas de plástico grandes con asa, recipientes de 10 cm de altura x 15 cm de diámetro, vasos desechables de 2.5 cm de altura x 4 cm de diámetro, vasos de plástico con tapas horadadas (5 cm de altura x 8 cm diámetro), solución antiséptica (etanol al 75%), hipoclorito de sodio acuoso al 3.5%, jabón y esponja para lavado; así como tijeras, cinta adhesiva, marcadores de distintos colores, clips y franelas. La cantidad de estos materiales es proporcional al tamaño y número de la totalidad de crías.

Preparación de la dieta artificial

El desarrollo de un método de preparación de una dieta artificial permitirá cultivar insectos de forma práctica y simple; debe cumplir con los requisitos nutricionales mínimos del insecto y también ser económicamente viable (Chacón-Castro *et al.*, 2009).

La proteína, como fuente de nitrógeno y aminoácidos, es esencial en la dieta de casi todas las especies de insectos. Las dietas artificiales que contienen germen de trigo y levadura como fuentes de proteínas proporcionaron el mejor desarrollo de *S. cosmioides*, un noctuido de la misma familia de *S. frugiperda*, por lo que se usaron en la implementación de la dieta (Di Bello *et al.*, 2017).

En el cuadro 1 se enlistan los reactivos usados para preparar un kilogramo de dieta artificial, según las indicaciones iniciales de Poitout y Bues (1974).

La dieta artificial se elaboró utilizando una batidora en un recipiente de plástico con capacidad de cuatro litros, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se calienta el agua destilada hasta ebullición.
- El agua caliente se coloca en el recipiente de plástico y se agrega el agar y se mezcla en la batidora hasta tener una consistencia uniforme.
- Se agrega la sémola de maíz, germen de trigo y levadura de cerveza, previamente mezclados entre sí, paulatinamente para evitar la formación de grumos, hasta obtener una consistencia de una papilla y se espera un momento para disminuir un poco la temperatura hasta una temperatura aproximada de 30 °C. La mezcla no se debe enfriar por completo.
- Se agrega el ácido benzoico y se mezcla bien.

- El resto de los ingredientes se mezcla, excepto la colina y el formaldehído, y se bate bien para integrarlos con la mezcla, la cual debe conservar una temperatura entre 50 a 60 °C para poder agregar estos ingredientes.
- La colina y el formaldehído se disuelven en agua destilada y se agregan a la mezcla, integrándolos poco a poco con la batidora. Debe evitarse que la mezcla se enfríe.
- Una vez que ya se terminó de mezclar todos los ingredientes con la batidora, se vierte la dieta en una caja de plástico con tapa hermética (25 cm largo x 15 cm ancho x 5 cm altura) forrada con una bolsa de polipapel, para que solidifique a temperatura ambiente. Una vez fría esta dieta se conserva en el refrigerador.

Cuadro 1

Reactivos para la elaboración de un kilogramo de dieta artificial

Reactivos	Cantidad
Agua destilada (mL)	600.0
Agar (g)	14.0
Sémola de maíz (g)	128.4
Germen de trigo (g)	32.1
Levadura de cerveza (g)	34.3
Ácido benzoico (g)	1.3
Metil parabeno sódico - Nipagin (g)	2.0
Ácido ascórbico (g)	4.5
Formaldehído al 38% (μ L)	300.0
Estreptomina - uso veterinario (g)	2.0
Colina al 15% (mL)	7.5
Vitaminas para aves (g)	2.0

Resultados

Colecta de material biológico de S. frugiperda en campo (pie de cría)

La colecta del pie de cría se realizó en los meses de junio a julio, cuando las plantaciones de maíz están en la fase de crecimiento vegetativo, etapa donde es más susceptible a las plagas (López-Pérez, 2008), específicamente antes de la temporada de lluvias. La colecta de material biológico se realizó en grupos de trabajo con entrenamiento previo y conocimiento básicos del insecto, siguiendo las indicaciones de Placencio-Alvarado (2015).

La colecta se realizó en plantas de maíz en la etapa de crecimiento vegetativo con signos de defoliación y restos de excremento del gusano cogollero (figura 2A). Se seleccionaron dos parcelas contiguas, las cuales no fueron tratadas con insecticidas o algún tipo de control de plagas para el gusano cogollero. En estas plantaciones se buscaron larvas de *S. frugiperda* del estadio 5 y 6 en el cogollo y en hojas de las plantas de maíz (figura 2B).

Se eligieron estos estadios por ser etapas que permiten individualizar cada larva y con esto evitar el canibalismo o contaminación del pie de cría (Mihm, 1984).

La bolsa de plástico con asas se amarró a la cintura y se procedió a seleccionar las larvas con pinzas entomológicas para transferirlas individualmente en vasos de plástico pequeños con tapas previamente horadadas con una aguja entomológica, lo que favorece la libre circulación de aire dentro del recipiente. Además, se colocó un pedazo de hoja joven de maíz (figura 2C) como alimento para trasladar a las larvas vivas al cuarto de cultivo, que se depositaron en la bolsa para seguir colectando. Se colectaron aproximadamente entre 400 a 500 larvas (López-Pérez, 2008), con la finalidad de conseguir una variedad genética suficiente y prevenir pérdidas de material biológico por enfermedades causadas por entomopatógenos y parásitos (Mihm, 1984).

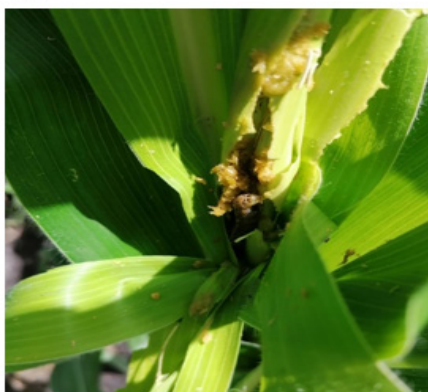
Figura 2

Colecta en campo de *Spodoptera frugiperda*. (A) Plantas de maíz con signos de defoliación, (B) larva de *S. frugiperda* encontrada en el cogollo de una planta, (C) larva colectada para su transporte al laboratorio, y (D) larvas colectadas para su cuarentena en el cuarto de cultivo

A



B



C



D



Una vez en el cuarto de cultivo, se acomodaron estos recipientes en las mesas de trabajo (figura 2D) y se mantuvieron en cuarentena, bajo 86% de humedad relativa, 25 ± 3 °C de temperatura promedio estimada y 12 horas luz de fotoperiodo (Villanueva, 2004). Los organismos colectados se revisaron cada tercer día y en caso necesario se cambiaron a un vaso limpio con una pequeña porción de dieta artificial (figura 3) (aproximadamente 1 cm³), manteniéndolas así hasta que alcanzaron la fase de pupa. Las larvas y pupas que presentaron contaminación por hongos o malformaciones físicas fueron y deben ser desechadas; por esta razón es importante que las larvas colectadas sean individualizadas desde el sitio de colecta para evitar que se contamine todo el pie de cría (Mihm, 1984). Deben cumplirse de dos a tres generaciones (ciclos de vida) de este material biológico antes de usarlo en los trabajos de investigación (López-Pérez, 2008).

Figura 3

Cambio de la larva a un recipiente limpio con dieta artificial, mantenida en el cuarto de cultivo



Otra forma de implementar la cría es mediante la donación de material biológico de otro laboratorio y se implementa cuando no es posible realizar la colecta en campo o cuando es necesaria renovar el material biológico por disminución de la variedad genética y así prevenir el colapso de la cría por malformaciones y enfermedades. Se recomienda realizar la renovación de la cría por colecta o donación de pupas, por lo menos cada año o cada 33 generaciones (ciclos de vida) en el laboratorio (Mihm, 1984).

Mantenimiento de la cría de *S. frugiperda* en el cuarto de cultivo

A continuación, se describe de manera detallada las actividades realizadas para el mantenimiento de la cría de *S. frugiperda* en laboratorio a partir del estado de pupa, palomilla, huevecillos y larvas, se adaptó este método derivado del propuesto por Mihm (1984), acorde a las condiciones y herramientas con las que se contaban en el laboratorio, lo cual propone una manera más accesible de mantener una colonia de este insecto en condiciones controladas.

Estas actividades de mantenimiento demandaron un trabajo de 3-5 horas en dependencia de la densidad poblacional de la cría. Según la experiencia adquirida, se recomienda trabajar cada tercer día, por lo menos con dos personas, cuando no se cuenta con la experiencia en el mantenimiento de la cría o cuando es muy grande y demanda mayor número de horas de trabajo.

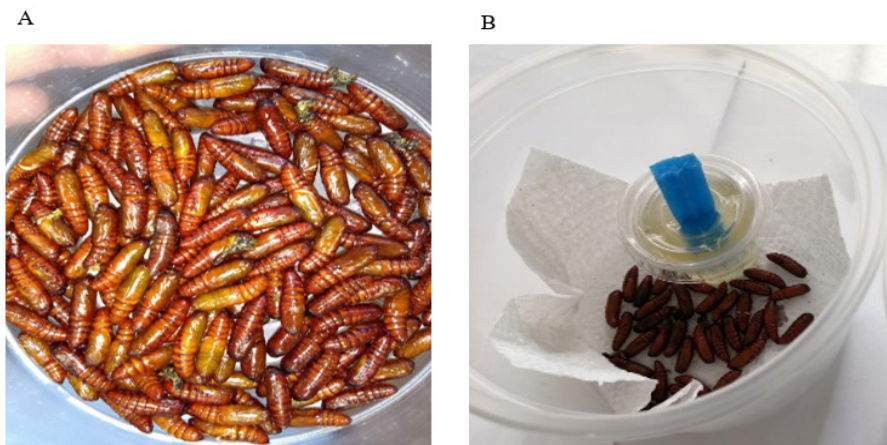
Colecta de pupas

Después de 8-10 días de haber individualizado las larvas, se revisaron los vasos de plástico y se procedió a colectar las pupas (figura 4A), se guardaron en recipientes de (10 cm altura x 15 cm diámetro) y a cada uno se le cubrió el fondo con papel *servitoalla*, colocando un vaso (2.5 cm de altura x 4.0 cm de diámetro) con miel de abeja al 15% (figura 4B). La tapa de este vaso debe tener un orificio por el cual se coloca un pedazo de esponja que se humedecerá por capilaridad. Este vaso con miel se pega con cinta adhesiva a la *servitoalla* que está en el fondo del recipiente, para evitar que se mueva y la miel se derrame; en contraste, la técnica de Mihm (1984) no señala ese paso.

Una vez listos los recipientes, se colocaron 30 pupas aproximadamente en cada uno y se taparon con una tapa con un pedazo de *servitoalla* adherido en su parte inferior. La tapa debe tener pequeños orificios para facilitar la circulación de aire, cerrar bien y estar rotulada con fecha y cantidad de pupas (Chacón-Castro *et al.*, 2009).

Figura 4

Pupas colectas (A) y colocadas en recipientes con miel al 15% (B)



Establecimiento de los ponederos para la reproducción de las palomillas

En una bolsa grande de papel de estraza del número 16 se colocaron dos vasos pequeños desechables (2.5 cm altura x 4.0 cm diámetro) con contenido de miel al 15%, pegados con cinta adhesiva tipo *masking tape* y tapa perforada, en la cual se coloca un trozo de esponja.

Los recipientes en los que se guardaron las pupas, y que estas se desarrollaron a la siguiente etapa de palomilla, se colocaron en refrigeración (15 °C) durante 3-5 min, y así adormecer a las palomillas para su recolección. Posteriormente se tomaron con pinzas entomológicas 20 individuos (idealmente 10 hembras y 10 machos) y se metieron a la bolsa de papel (figura 5), la cual se cerró doblando un cm en el extremo y colocando dos clips, para finalmente etiquetar con la fecha en que se estableció el ponedero.

En el cambio de ponedero se abrieron las bolsas de papel de estraza, después de haberlas refrigerado a 15 °C durante 3-5 min, con mucho cuidado para evitar que escaparan las palomillas. Se retiraron los vasos con miel, y los adultos se vaciaron a otra bolsa con vasos de miel fresca. En cada cambio de ponedero se registró la misma fecha y el número de puesta de huevecillos. Después de la quinta puesta, los adultos ya no ponen huevecillos y comienzan a morir. Estos ponederos se cambiaron al menos tres veces por semana, según la recomendación de Mihm (1984).

Figura 5

Ponederos y vasos con miel fresca al 15%



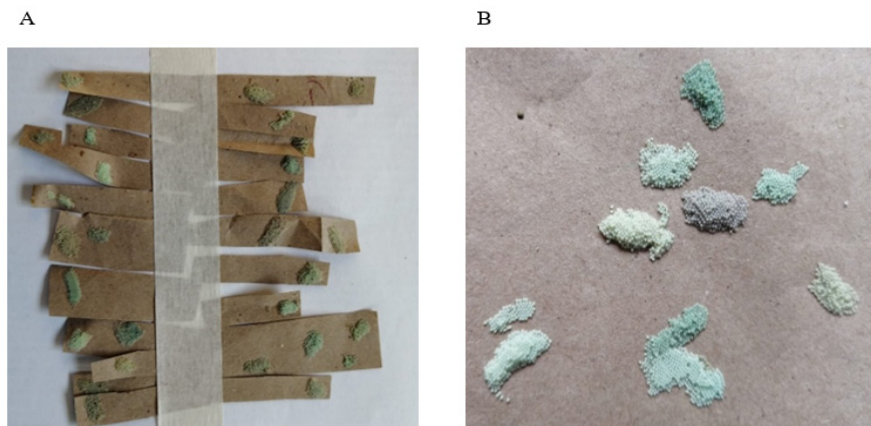
Colecta de huevecillos

Los pedazos de papel donde se encuentran las masas de los huevecillos se recortaron y se separaron por su coloración (figura 6A): verde, rosa, gris, café; para obtener una uniformidad del material biológico en sus diferentes estadios larvarios, según lo recomendado por Mihm (1984).

Los trozos de papel que contienen los huevecillos se pegaron con cinta a una hoja de papel, evitando que el pegamento de la cinta estuviera en contacto con los huevecillos y prevenir que las larvas se pegaran a la cinta cuando eclosionaran (figura 6B). Esta hoja que evita el exceso de humedad y retarda la aparición de hongos patógenos, se coloca debajo de la tapa de plástico hermética, misma que debe tener orificios pequeños para facilitar la circulación de aire y estar rotulada con fecha y estadio para llevar un registro del ciclo biológico (Chacón-Castro *et al.*, 2009).

Figura 6

Masas de huevecillos colectadas (A) y separadas de acuerdo con su coloración (B)



Limpieza y alimentación de las larvas

En esta etapa es importante no sólo la alimentación sino también la limpieza de los recipientes que contienen a las larvas (Mihm, 1984). Las larvas de primer, segundo, tercer, cuarto y quinto instar se colocaron en cajas herméticas de plástico limpias, con trozos de dieta fresca distribuida de manera uniforme, con una hoja de papel bajo la tapa, la cual tenía orificios pequeños para facilitar la circulación de aire (Chacón-Castro *et al.*, 2009). En esta etapa, el material biológico se manipuló de un recipiente a otro con pinceles suaves y pinzas entomológicas; preferentemente, las larvas de los primeros tres instares, L_1 , L_2 y L_3 (2-10 mm longitud), no se cambian de caja para evitar pérdida del material biológico, puesto que en esta fase suele haber pérdidas de entre el 10 a 20% a causa de la manipulación, exceso de humedad en la dieta y canibalismo (Negrete y Morales, 2003). Por ello, el papel estraza donde están pegados los huevecillos se quita, si es necesario se cambia la hoja de papel (no debe estar rota, ni húmeda) y se agregan porciones de dieta fresca. Es importante que la dieta no tenga demasiada humedad para evitar que las larvas mueran ahogadas en ella (figura 7).

A partir del cuarto instar (tamaño de 11-15mm) las larvas deben ser cambiadas de la caja hermética de manera continua y se debe disminuir la cantidad de larvas por caja

(figura 8), ya que en esta fase la causa principal de pérdida del material biológico ocurre por canibalismo. La alimentación y limpieza de las larvas debe realizarse cada tercer día para evitar la aparición de hongos patógenos por excretas (SENASA, 2015).

Figura 7

Alimentación de larvas neonatas



Figura 8

Cambio de larvas a una caja limpia con dieta



Individualización de larvas

Una vez que las larvas alcanzan el sexto instar (tamaño aproximado de 34 mm) disminuyen su ingesta de alimento y su color comienza a cambiar a un verde con tono plumizo, lo que indica que las larvas entran en la fase de prepupa (Villanueva, 2004). Cada larva se colocó en un vaso desechable con tapa (2.5 cm de altura x 4.0 cm de diámetro) y con un trozo de dieta y un pedazo de *servitoalla* debajo de la tapa (figura 9), la cual tenía orificios pequeños para facilitar la circulación del aire, y registrando la fecha en que se individualizan. La cantidad de larvas a individualizar fue de 100-200 aproximadamente cada tercer día. Con el propósito de mantener las medidas de protección y cuidado del pie de cría, las larvas que presentaron daños por canibalismos o síntomas de enfermedad no se individualizaron y fueron desechadas (Chacón-Castro *et al.*, 2009).

Figura 9

Larvas individualizadas con una porción de dieta



Control de la densidad poblacional del pie de cría

El mantenimiento de la cría de *S. frugiperda* es un trabajo demandante que requiere de muchos cuidados para obtener un material biológico en estado óptimo al momento de realizar los ensayos de experimentación; por lo que la dimensión del pie de la cría dependerá de la demanda de este material biológico para el trabajo investigación en el laboratorio.

Es recomendable reducir la dimensión del pie de cría durante los periodos vacacionales, por la disponibilidad de personal para realizar el trabajo de mantenimiento. En función de la fase en la que se encuentre el pie de cría, el ciclo biológico se puede prolongar para realizar el mantenimiento una o dos veces por semana. Para lograr esto se guarda el material biológico en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C (Mihm, 1984). El material que se desea eliminar se deja en refrigeración a una temperatura de 5 °C durante 24 h, y se desecha.

Para aumentar la densidad poblacional del material biológico, a partir del cuarto estadio se requiere disminuir la densidad de la población en cada recipiente y poner dieta suficiente, conservando el mantenimiento de cada tercer día, retirando y reemplazando la hoja de papel que se coloca bajo la tapa y observando que no se presente la incidencia de patógenos.

La tasa de supervivencia del pie de cría puede ser estimada seleccionando una muestra de huevecillos y, para obtenerla, fueron monitoreados por separado aproximadamente 400 recién puestos, hasta la etapa adulta. Los resultados obtenidos durante dos ciclos fueron de una tasa de supervivencia promedio de 85%, como se muestran en el cuadro 2. Otra forma de estimar la tasa de supervivencia es contar el número de pupas, sexarlas, contar el número de parejas de adultos y estimar el número promedio de huevecillo por hembra.

Evaluación de la supervivencia con el método de cría propuesto

Para determinar la efectividad del método de cría se tomaron huevecillos y se observó su desarrollo hasta complementar el ciclo, la supervivencia es de 85% para la etapa adulta (cuadro 2).

Cuadro 2

Evaluación de la supervivencia de *Spodoptera frugiperda*

Estadio	Individuos (número)
Huevecillo	300
Larvas del 3 ^{er} instar	280
Larvas del 5-6 instar	268
Pupas	259
Adultos	255

Selección de estadio para ensayos de prueba en laboratorio: larvas de tercer estadio

Las larvas de *S. frugiperda* que comúnmente se usan en ensayos de laboratorio son las que se encuentran en el tercer estadio; para obtenerlas, se debe manejar en condiciones controladas durante los primeros estadios L_1 - L_3 , por lo que se recomienda usar una cámara de crecimiento. Las masas de huevecillos se separan por coloración en diferentes cajas y se rotulan con la fecha. Una vez que las larvas eclosionan se mantienen en la caja a una temperatura constante de 25 °C y humedad relativa de 84%, agregando dieta suficiente para el desarrollo de las larvas durante una semana.

Figura 10

Larva en estadio L₃ de *S. frugiperda*



En un tiempo aproximado de 7 a 10 días de la eclosión de los huevecillos se obtienen larvas del tercer estadio (L₃) donde, para la determinación de este estadio, se toma en cuenta la coloración de las larvas: al inicio se empieza a desarrollar una coloración rojiza por todo el cuerpo de la larva y la evidente aparición de una banda oscura en el costado, su tamaño es de aproximadamente 8-10 mm y pesan de 3.5 a 6.0 mg (figura 10). Si se mantiene una temperatura de 23 ± 2 °C, las larvas se conservan en el estadio L₃ aproximadamente durante dos días (Villanueva, 2004).

Inconvenientes comunes en el mantenimiento de la cría

Los problemas comunes que se presentaron durante el mantenimiento de la cría de *S. frugiperda* y las recomendaciones para resolverlos se describen a continuación.

Preparación de la dieta

La consistencia de la dieta es clave en el mantenimiento de la cría, demasiada húmeda puede causar pérdidas en larvas de los primeros estadios y favorecer la aparición de agentes patógenos. La solución recomendada a esta problemática es disminuir la cantidad de agua y aumentar ligeramente el porcentaje del agar o de la sémola de maíz para conseguir una mejor consistencia, hasta una temperatura aproximada de 30 °C (figura 11).

Figura 11

Consistencia adecuada de la dieta artificial para alimentación de larvas



Estadio larval

Como se mencionó anteriormente, en los primeros cuatro estadios las pérdidas de material biológico suelen presentarse por humedad excesiva y por manipulación inadecuada con pinzas o pinceles, se recomienda el uso de pinceles con cerdas suaves de uso cosmético y en lo posible evitar la manipulación con pinzas en los primeros estadios, así como mantener las larvas en el recipiente hasta el cuarto estadio larval sin cambiarlas, retirando las excretas con el pincel.

S. frugiperda presenta altos niveles de canibalismo en todas las etapas y es mayor en los últimos estadios (Mihm, 1984). Para disminuir pérdidas por canibalismo, se recomienda disminuir la densidad de la población a partir del cuarto estadio en cada recipiente y poner dieta suficiente para evitar saturación de larvas (figura 12).

Figura 12

Baja densidad de larvas de quinto instar de *S. frugiperda*



Pupas

En esta etapa es común que algunas larvas no concreten el cambio de instar debido a contaminación o malformación durante el proceso. La medida de control aplicada en este instar es reducir al mínimo el movimiento y manipulación del material mientras se encuentra en esta fase. También se deben desechar las pupas que presenten malformaciones para evitar contaminación del material biológico (figura 13); en este caso, es conveniente renovar el material biológico mediante una colecta en campo. Otra medida de control en esta etapa es mantener limpios y esterilizados a todos los recipientes donde se individualiza a las larvas.

Adultos

En la etapa adulta se pueden presentar malformaciones y desarrollos incompletos por enfermedades y endogamia. La medida de control es desechar todos los individuos que no estén sanos, además manipularlos lo menos posible, poner a los adultos en refrigeración al momento de cambiar los ponederos y renovar el pie de cría.

Figura 13

Malformaciones en pupas (A) y palomillas (B) de *S. frugiperda*



Discusión

Comparación y similitudes con los métodos consultados

Como se mencionó anteriormente, este trabajo está basado principalmente en el descrito por Mihm (1984), también se consultaron otros autores, como Luna-López (2013), SENASA (2015), Chacón-Castro *et al.* (2009), Huerta-Valdovinos *et al.* (2016), quienes coinciden en la importancia de los requerimientos básicos para el mantenimiento de la cría: temperatura, humedad relativa y dieta nutricional, como requisitos indispensables en el desarrollo de una metodología de crianza de *S. frugiperda*.

Este trabajo, además de ser una recopilación, es una guía práctica, sencilla y eficaz para mantener una colonia de mediana densidad, donde se procura utilizar lo mejor de cada uno de los métodos citados desde la colecta en campo hasta la obtención de cada uno de los estadios que conforman el ciclo biológico de *S. frugiperda*. Se usaron materiales fácilmente disponibles y de bajo costo que garantizaron el desarrollo óptimo del insecto, lo cual proporcionó resultados favorables en los últimos cuatro años.

A continuación, se describe una breve comparación entre los diferentes métodos y el desarrollado en este trabajo, incluyendo la etapa del pie de cría y los diferentes estadios del ciclo de *S. frugiperda*.

Pie de cría

Mihm (1984) señaló que para mantener saludable una colonia de insectos es necesario reemplazarla o mezclarla genéticamente con cepas silvestres, mientras que Chacón-Castro *et al.* (2009) inició su metodología con la colecta en campo del pie de cría y Luna-López (2013) recomendó la colecta de larvas del último instar.

En este trabajo, el pie de cría se renueva cada año con una colecta en campo de larvas de los últimos instares, pues son los más fáciles de manejar. Además, se aumenta la supervivencia de las larvas al individualizarlas en campo al evitar el canibalismo y la contaminación de agentes patógenos entre ellas.

Palomillas

Mihm (1984), SENASA (2015) y Huerta-Valdovinos *et al.* (2016) utilizaron bolsas de papel estraza como jaulas de apareamiento donde toda la bolsa funciona como sustrato para la puesta de huevecillos; No obstante, Chacón-Castro *et al.* (2009) usaron jaulas de apareamiento a recipientes de plástico recubiertos por papel.

En este caso se encontró que las jaulas de bolsas de papel estraza fueron más útiles por ser sencillas de manejar al momento de colectar los huevecillos. En esta etapa también se siguió la técnica de Luna-López (2013), de adormecer los adultos para evitar dañarlos al momento de colocarlos en las jaulas, además de colocar de 25 a 30 parejas de adultos en bolsas número 16 y realizar el cambio de ponederos cada tercer día para obtener un mayor número de masas de huevecillos.

Huevecillos

Mihm (1984) recomienda colocar las jaulas de apareamiento en bolsas de papel encerado y recolectar las masas de huevecillos raspándolas con una espátula, así como depositarlos en recipientes cilíndricos para incubarlos; mientras que Chacón-Castro *et al.* (2009), utilizan plantas de maíz como sustrato para la puesta de huevecillos y posteriormente recubren la jaula con papel bond.

Se utilizó la técnica de Luna-López (2013) y Chacón-Castro *et al.* (2009), de recortar las masas de huevecillos adheridas al sustrato y pegarlas en hojas de papel. Se colocan de 10 a 15 masas la tapa de cada recipiente de plástico (figura 6A). Es común que no

todas las masas de huevecillos eclosionen, por esta razón se remueven las larvas recién eclosionadas y las de sin eclosionar adheridas a la hoja y se cambian a otro recipiente.

Larvas

En el trabajo de Mihm (1984), la mayoría de las larvas se destinaban para infestación de plantas de maíz y las sobrantes se usaban para mantener el pie de cría, se colocaban en la dieta para que concluyeran su desarrollo y pasaran a pupa. Este procedimiento es similar al implementado por SENASA (2015) y Luna-López (2013), aunque las larvas se usaban para bioensayos.

En este procedimiento se implementó el manejo de estadio larvario por separado por cohortes desde la eclosión, con la finalidad de obtener larvas de la misma edad en cada estadio, además de reducir la cantidad de larvas por recipiente a medida que aumenta el tamaño poblacional. Esto permite controlar pérdidas por canibalismo y la extracción de material para bioensayos sin afectar el tamaño del pie de cría.

Pupas

En esta etapa, Mihm (1984) y SENASA (2015) agruparon las larvas de los últimos instares en celdas con divisiones de forma masiva, mientras que Chacón-Castro *et al.* (2009) y Luna-López (2013) las individualizaban de forma separada. Al entrar en estado de pupa, solo Chacón-Castro *et al.* (2009) implementaron el uso de jaulas de desarrollo.

Al igual que Chacón-Castro *et al.* (2009), en este trabajo se implementaron jaulas de desarrollo de pupas, lo que permitió tener control del número de adultos en el momento que emergen y cambiarlos a los ponederos para determinar el número de parejas por bolsa.

La mayoría los métodos de cría de *S. frugiperda* son mencionados en trabajos de investigación, tesis o manuales de cría de diversos insectos. El documento más específico para *S. frugiperda* es el de Mihm (1984), quien detalla el método de cría del insecto y una secuencia para la infestación eficiente en campo.

Conclusiones

Se presenta un aporte para la cría del gusano cogollero en condiciones de laboratorio con poca infraestructura y bajo presupuesto.

El método de cría está basado en literatura publicada y tesis de grado, fue adaptado mediante la práctica constante y se señalan adaptaciones en la mayoría de las fases del método de recolección en el campo, cría y obtención de adultos y huevecillos.

Con los procedimientos presentados aquí, se puede lograr una supervivencia de 85% a partir de huevecillos a adultos y proveer larvas adecuadas para experimentación.

Agradecimientos

Al Ing. Helios Escobedo Cruz por su acompañamiento y asesoría en la colecta en campo del pie de cría. Al M. en C. Víctor José Trejo Meléndez, M. en C. Arturo Ramírez Ordorica y a la pasante de Ecología Fernanda Vázquez Fuerte, por la colecta en campo de pie de cría y por su colaboración en el mantenimiento la colonia. Este trabajo fue apoyado

por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través de la Dirección de Asuntos del Personal Académico (Proyecto DGAPA-PAPIIT-IG200821), el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM, (IIES-POFJEG) y por fondos personales de FJEG.

Literatura citada

- Baloch, M.N.; Fan, J.; Haseeb, M. y Zhang, R. (2020). Mapping potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in central Asia. *Insects*. 11(3): 172.
- CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International). (2017). *New report reveals cost of fall armyworm to farmers in Africa, provides recommendations for control*. <https://www.cabi.org/news-article/new-report-reveals-cost-of-fall-armyworm-to-farmers-in-africa-provides-recommendations-for-control/>. (Consultada 9 septiembre 2022).
- Chacón-Castro, Y.; Garita-Rojas, C.; Vaglio-Cedeño, C. y Villalba-Velásquez, 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. *Tecnol Marcha*. 22(4): 28-37.
- Di Bello, M.M.; Souza, B.H.S.; Nogueira, L.; Ribeiro, Z.A.; Eduardo, W.I. y Boiça-Júnior, A.L. (2017). Optimization of methodology for rearing *Spodoptera albula* on artificial diet. *Neotrop Entomol*. 46: 546-553. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0490-6>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2017). *Ciclo biológico del gusano cogollero del maíz (en américa latina)*. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/fc84eb0c-29df-475e-9d88-8a73957e9d1b/>. (Consultada 6 julio 2020).
- García-Neárez, G. y Tarango-Rivero, S.H. (2009). *Manejo biorracional del gusano cogollero en maíz*. Folleto Técnico No. 30. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Norte-Centro, Campo Experimental Delicias, México. 34 p.
- Hoffmann, A.A. y Ross, P.A. (2018). Rates and patterns of laboratory adaptation in (mostly) insects. *J Econ Entomol*. 111(2): 501-509. <https://doi.org/10.1093/jee/toy024>
- Huerta-Valdivinos, F.; García-Banderas, D.V.; Figueroa-De la Rosa, J.I.; Pineda-Guillermo, S.; Chavarrieta, M. y Martínez-Castillo, A.M. (2016). Reproducción y desarrollo de poblaciones de campo del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomología mexicana*. 3: 311-315.
- Jing, W.A.N.; Huang, C.; Li, C.Y.; Zhou, H.X.; Ren, Y.L.; Li, Z.Y.; y Wan, F.H. (2021). Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Integr Agric*. 20(3): 646-663. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63367-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63367-6)
- López-Pérez, J.T. (2008). *Selección artificial para el gusano cogollero Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) con el virus SfNPV y efectividad biológica en campo en combinación con un abrillantador óptico*. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias biológicas y Agropecuarias. Las agujas, Zapopan, Jalisco México. 71 p.
- Luna-López, A.M. (2013). *Evaluación de dietas alternativas en la producción del gusano cogollero Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) bajo condiciones de laboratorio*. Tesis presentada obtener el título de Ingeniero en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 71 p.
- Mihm, J.A. (1984). *Técnicas eficientes para la crianza masiva e infestación de insectos, en la selección de las plantas hospedantes para resistencia al gusano cogollero, Spodoptera frugiperda*. CIMMYT Publications Repository. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México. 23 p.
- Montezano, D.G.; Specht, A.; Sosa-Gómez, D.R.; Roque-Specht, V.F.; Souza Silva, J.C.; Peterson, J.A. y Hunt, T.E. (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*. 26(2): 286-300. <https://doi.org/10.4001/003.026.0286>
- Murúa M.G.; Virla, E.G. y Defagó, V. (2003). *Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de*

- himenópteros parasitoides*. <https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-29-01-043-051.pdf>. (Consultada 10 abril 2021).
- Negrete, F. y Morales, J. (2003). *Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/2220>. (Consultada 18 junio 2020).
- Placencio-Alvarado, F.E. (2015). *Descripción etológica del gusano cogollero del cultivo de maíz (Zea mays L.), en laboratorio*. Ceasa, sector Salache, provincia de Cotopaxi 2015. Tesis presentada para obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Cotopaxi, Ecuador. 83 p.
- Poitout, S. y Bues, R. (1974). Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Artiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. (Cría de orugas de veintiocho especies de Lepidoptera Noctuidae y dos especies de Artiidae en medios artificiales simples. Particularidades de la cría según las especies). *Annales de Zoologie et Ecologie Animale*. 6 (3): 431-441.
- Ramzan, M.; Ilahi, H.; Adnan, M.; Ullah, A.; y Ullah, A. (2021). Observation on Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on maize under laboratory conditions. *Egypt Acad J. Biol Sci*. 14(1): 99-104. DOI: 10.21608/eajbsa.2021.152337
- Sarkar, S.; More, S.A.; Tamboli, N.D.; Kulkarni, S.R. y Nimbalkar, C.A. (2021). Effect of temperature on the reproductive ability of Fall Armyworm-*Spodoptera frugiperda* (JE Smith) under laboratory condition. *J. Pharmacogn Phytochem*. 10(6): 154-158. <https://www.phytojournal.com/archives/2021/vol10issue6/PartB/10-5-149-691.pdf>
- SENASA, (2015). *Centro de Control Biológico, Guía de prácticas de producción de insectos benéficos*. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Gu%C3%ADa-Pr%C3%A1ctica-producci%C3%B3n-Insectos-Ben%C3%A9ficos.pdf>. (Consultada 20 julio 2020).
- Soto-Alcalá, J. (2008). *Caracterización molecular de aislamiento de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda*. Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Secretaría de Investigación Posgrados. 87 p.
- Villanueva, R.E. (2004). *Estudio de la biología de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) "Gusano cogollero del maíz" usando cuatro sustratos alimenticios, en Tingo María*. Tesis presentada para obtener el grado de ingeniero agronomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de agronomía, Tingo María, Perú. 142 p.

Recepción: 27 de julio de 2022

Arbitraje: 30 de agosto de 2022

Dictamen: 14 de septiembre 2022

Aceptado: 23 de octubre 2022