



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**Fluctuación poblacional, extracción de la feromona sexual y cría de la fase larvaria de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae)**

**MANUEL JIMÉNEZ VÁSQUEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2017

La presente tesis titulada: **Fluctuación poblacional, extracción de la feromona sexual y cría de la fase larvaria de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**, realizada por el alumno: **Manuel Jiménez Vásquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

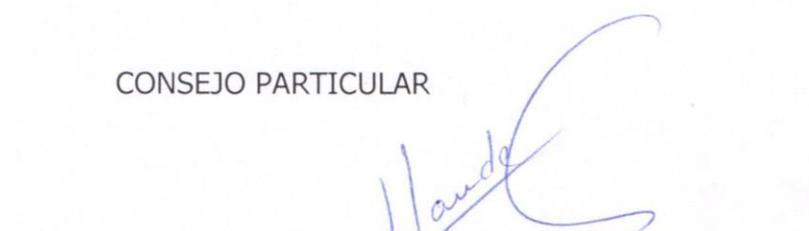
DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA CELINA MICAELA LLANDERAL CÁZARES

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ROSA MARÍA LÓPEZ ROMERO

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. KALINA MIRANDA PERKINS

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. ALEJANDRO PÉREZ PANDURO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2017

**Fluctuación poblacional, extracción de la feromona sexual y cría de la fase larvaria de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

Manuel Jiménez Vásquez Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

**RESUMEN GENERAL**

El gusano rojo de maguey *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt es un insecto comestible en su estado de larva, que se consume por su sabor y valor nutritivo. El incremento en su demanda y su alto costo han generado su sobreexplotación y la reducción en las poblaciones silvestres, lo que ha motivado al estudio de su biología y comportamiento. Los objetivos de la presente investigación fueron monitorear el período de emergencia y determinar la fluctuación poblacional de adultos de *C. redtenbacheri* con diferentes trampas, en poblaciones nativas de su hospedero natural *Agave salmiana* en los municipios de Teotihuacán y Otumba, Estado de México, identificar los componentes de la feromona sexual mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y formular una dieta merídica que permita la cría del estado larvario en condiciones de laboratorio. La trampa de luz ultravioleta permitió la captura de insectos y se logró registrar la fluctuación de adultos de *C. redtenbacheri* que comprende 157 días en los meses de diciembre a mayo, con mayor emergencia a mediados y finales del mes de febrero para Teotihuacán, y 137 días para Otumba. Mediante las técnicas de extracción se logró identificar dos compuestos feromonales sexuales de las hembras de *C. redtenbacheri* (Z)-5-Tetradecen-01-acetato y (Z)-9-Tetradecen-01-acetato, con una proporción de 3.8:1, con los mejores resultados con respecto a la limpieza de los cromatogramas con las técnicas de microextracción en fase sólida. Para el caso de la cría de la fase larvaria del gusano rojo del maguey, se obtuvo una dieta en la que se logró desarrollar la larva hasta el quinto instar y se determinó que los primeros instares requieren de una dieta de consistencia blanda, mientras que conforme avanza el desarrollo de los estadios larvales es más adecuada una de mayor consistencia.

**Palabras clave:** *Comadia redtenbacheri*, *Agave*, trampeo, luz ultravioleta, emergencia, feromona sexual, cría, dietas artificiales.

**Population fluctuation, sexual pheromone extraction and breeding of the larval stage of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae)**

Manuel Jiménez Vásquez Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2017

**GENERAL ABSTRACT**

The maguey redworm, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) is an edible insect during its larval stage, which is consumed for its taste and nutritive value. The increment in its demand and its high cost have generated its overexploitation and the reduction of wild populations, which has motivated the study of its biology and behaviour. The objectives of this research were to monitor the period of emergency and determine the population fluctuation of adults of *C. redtenbacheri* with different traps, in native populations of its natural host *Agave salmiana* in the municipalities of Teotihuacán and Otumba, State of Mexico, identify the components of the sexual pheromone using gas chromatography coupled with mass spectrometry, and formulate a meridic diet that allows the raise of the larval stage in laboratory. The ultraviolet light trap allowed the capture of insects and the population fluctuation of adults of *C. redtenbacheri* was recorded, which comprises 157 days in the months of December to May, with a highest emergence during the middle and end of the month of February for Teotihuacán, and 137 days for Otumba. Using the extraction techniques it was possible to identify two components of the sexual pheromone of females of *C. redtenbacheri* (Z)-5-Tetradecen-o1-acetate and (Z)-9-Tetradecen-o1-acetate, with a ratio of 3.8:1, with the best results with respect to the cleanliness of the chromatograms with the techniques of solid phase microextraction. For the case of the raising of the larval stage of the maguey redworm, a diet was obtained where up to the fifth instar was able to develop and it was determined that the first instars need a diet of soft consistence, whereas as the development of the larval stages advances, it is more adequate one of more consistence.

**Keywords:** *Comadia redtenbacheri*, *Agave*, trapping, ultraviolet light, emergence, sexual pheromone, raising, artificial diets.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por los recursos económicos que me permitieron realizar mis estudios de doctorado y por el financiamiento otorgado por parte del Proyecto 166898 (Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm.), que permitió realizar esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por ser una hermosa institución que prepara profesionistas para el campo mexicano.

A la Dra. Celina por todas sus enseñanzas, por su excelente vocación como directora y consejera, por su disponibilidad de tiempo y por mostrarse siempre dispuesta para apoyarme.

A la Dra. Rosa María López Romero por su tiempo, paciencia y observaciones para obtener resultados de un capítulo de esta tesis.

Al resto del consejo particular: Dra. Kalina Miranda Perkins, Dr. Mateo Vargas Hernández y Dr. Alejandro Pérez Panduro, por todas sus observaciones y sugerencias en la investigación y para la mejora de este documento.

A los productores de la comunidad de Santiago Zacualuca, Teotihuacán, y San Miguel Xolco, Otumba, Estado de México, por permitirme realizar parte de mi investigación en las plantaciones de *Agave salmiana* de su propiedad.

Al Dr. Julio Rojas de Ecosur Tapachula, por el apoyo en proporcionarnos el estándar Z9-14.Ac.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Lorena, Ricardo, Norma y Rosario por todos los momentos gratos que pasamos.

A los amigos: Diana, Alfredo, Víctor, Moisés, Emiliano, Enrique, Santos y Jesús, por los gratos momentos que hicieron amena mi estancia en el Colegio.

A todos los compañeros, amigos y personas que me apoyaron directa e indirectamente en esta etapa.

## **DEDICATORIA**

**A mi esposa Mariana**, por todo el apoyo, motivación y comprensión para culminar esta meta. Es mi motivación y fuerza para seguir siempre adelante en la vida. Persona maravillosa de quien aprendo algo nuevo cada día.

**A mis padres:** Herminia Vázquez y Trinidad Jiménez por la ayuda, motivación y apoyo incondicional a pesar de la distancia. Por ser grandes personas que me han enseñado a ser persistente y guerrero en todas las adversidades que la vida me ponga.

**A mis hermanas y hermanos** por su cariño, apoyo y buenas vibras que siempre me brindan en los buenos y malos momentos en este andar de la vida.

**A la familia Palma Tenango**, que ya son parte de mi familia y de quienes he recibido apoyo, cariño y buenos momentos.

**A mi cuñada Ángeles** por sus incansables risas que hacen que la vida no se tan rutinaria.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN GENERAL .....</b>	<b>ii</b>
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
LITERATURA CITADA .....	3
<b>Capítulo 1. Fluctuación poblacional de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae) .....</b>	<b>5</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
1.2.1. Área de estudio .....	9
1.2.2. Tipos de trampas.....	9
1.2.2.1. Tipo Delta.....	9
1.2.2.2. Tipo Funnel® .....	10
1.2.2.3. Trampa con luz UV .....	11
1.2.3. Captura de insectos.....	12
1.2.4. Temperatura y humedad relativa de los lugares de estudios.....	13
1.2.5. Análisis estadístico .....	14
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
1.4. CONCLUSIONES .....	23
1.5. LITERATURA CITADA .....	24
<b>Capítulo 2. Feromona sexual de <i>Comadia redtenbacheri</i> (Lepidoptera: Cossidae) .....</b>	<b>28</b>
2.1. INTRODUCCIÓN .....	30
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.2.1. Material biológico .....	32
2.2.2. Extracción de los compuestos feromonales .....	34
2.2.2.1. Micro extracción en fase sólida .....	34
2.2.2.2. Extracción con disolvente orgánico .....	38
2.2.3. Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-DSM) .....	40
2.2.4. Preparación de los estándares .....	41
2.2.5. Comparación de diferentes técnicas .....	41

2.2.6. Análisis estadístico .....	41
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
2.3.1. <i>Microextracción en fase sólida</i> .....	42
2.3.2. Extracción con disolvente orgánico .....	48
2.3.3. Cuantificación de los componentes de la feromona de <i>C. redtenbacheri</i> .....	52
2.3.4. Análisis de los extractos de la feromona sexual por CG-DSM.....	52
2.3.5. Comparación de las diferentes técnicas de extracción.....	53
2.4. CONCLUSIONES.....	57
2.5. LITERATURA CITADA .....	58
<b>Capítulo 3. Dieta artificial para cría del estado larvario de <i>Comadia redtenbacheri</i></b> <b>(Lepidoptera: Cossidae) .....</b>	<b>62</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	64
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
3.2.1. Descripción de las larvas .....	68
3.2.2. Descripción de los tratamientos .....	71
3.2.3. Variables respuestas .....	76
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
3.4. CONCLUSIONES.....	88
3.5. LITERATURA CITADA .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Capítulo 1.</b>	Pág.
<b>Figura 1.</b> Trampa tipo Delta en penca de maguey.....	10
<b>Figura 2.</b> Trampa tipo Funnel.....	11
<b>Figura 3.</b> Trampa de luz ultravioleta.....	12
<b>Figura 4.</b> Secado de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	13
<b>Figura 5.</b> Dimorfismo de antenas en hembra (izquierda) y macho (derecha) de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	13
<b>Figura 6.</b> Captura promedio de hembras y machos de los tres períodos evaluados en Teotihuacán.....	15
<b>Figura 7.</b> Captura promedio de hembras y machos de los dos períodos evaluados en Otumba.....	16
<b>Figura 8.</b> Fluctuación poblacional de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> y temperatura media por semana en los tres períodos evaluados en Teotihuacán, Estado de México.....	19
<b>Figura 9.</b> Fluctuación poblacional de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> y temperatura en los dos períodos evaluados en Otumba, Estado de México.....	20
<b>Figura 10.</b> Fluctuación poblacional de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> y humedad relativa promedio por semana, en los tres períodos, en Teotihuacán.....	21
<b>Figura 11.</b> Fluctuación poblacional de adultos de <i>Comadia redtenbacheri</i> y humedad relativa en los dos períodos, en Otumba.....	22
 <b>CAPÍTULO 2.</b>	
<b>Figura 1.</b> Larvas de <i>Comadia redtenbacheri</i> de sexto y séptimo instares.....	32
<b>Figura 2.</b> Hembras adultas de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	33
<b>Figura 3.</b> Hembra de <i>Comadia redtenbacheri</i> con el ovipositor extendido en posición de llamado.....	34
<b>Figura 4.</b> a) Frotado de fibra sobre glándula y b) acercamiento de fibra en glándulas de hembras de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> a) Exposición de fibra, b) Hembras vivas de <i>Comadia redtenbacheri</i> dentro de viales.....	37

<b>Figura 6.</b> a) Calentado de vial con glándulas de <i>Comadia redtenbacheri</i> , b) exposición de fibra después del calentado.....	38
<b>Figura 7.</b> Corte de glándulas de hembras de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	39
<b>Figura 8.</b> Glándulas con hexano en vial con inserto.....	39
<b>Figura 9.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en <i>Comadia redtenbacheri</i> , con dos horas de exposición a la fibra de PDMS, a 0.5 cm de las glándulas.....	42
<b>Figura 10.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en <i>C. redtenbacheri</i> con 30 min de exposición a la fibra de PDMS a 0.5 cm de cada glándula (n = 7).....	43
<b>Figura 11.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en <i>C. redtenbacheri</i> en 2015, en función del tiempo de exposición y número de hembras vivas (vial 20 HS mL).....	44
<b>Figura 12.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en <i>C. redtenbacheri</i> , en 2016 en una hembra viva (vial 20 HS mL) en función del tiempo de exposición de la fibra.....	45
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de MEFS con calentado de 25 glándulas a 170 °C por 10 min y exposición de fibra durante 5 min.....	46
<b>Figura 14.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en <i>C. redtenbacheri</i> , en función del número de glándulas calentadas a 170 °C por 10 min y exposición de la fibra durante 5 min.....	47
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de 10 glándulas expuestas 12 horas en 200 µL de hexano.....	48
<b>Figura 16.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en función del número de glándulas expuestas en disolvente 12 h.....	49
<b>Figura 17.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en función del número de glándulas y tiempo de exposición en hexano.....	50
<b>Figura 18.</b> Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac por glándula con 10 minutos de exposición en el disolvente hexano (n = 11).....	51
<b>Figura 19.</b> Curvas de calibración de a) Z5-14:Ac (r = 0.9989) y b) Z9-14:Ac (r = 0.9994).....	52
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de a) una muestra y b) estándares Z5-14:Ac y Z9-14:Ac 27 µg/g y 16 µg/g.....	53
<b>Figura 21.</b> Áreas de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac encontrados con diferentes técnicas con una glándula de <i>C. redtenbacheri</i> .....	54

<b>Figura 22.</b> Cromatogramas de muestras obtenidas con distintas técnicas de captura de volátiles: a) glándula en hexano, b) MEFS calentado de glándulas, c) MEFS modo directo y d) MEFS con hembras vivas.....	56
--	----

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1.</b> Diagrama descriptivo del proceso de preparación de dieta artificial para <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	68
<b>Figura 2.</b> Larvas comerciales procedentes de Hueypoxtla y Pozos, Hidalgo, México.....	69
<b>Figura 3.</b> Obtención directa de larvas jóvenes de <i>Comadia redtenbacheri</i> de plantas de magueyes.....	70
<b>Figura 4.</b> Larvas de primer instar nacidas en laboratorio.....	70
<b>Figura 5.</b> Frascos con cada una de las dietas con larvas comerciales.....	71
<b>Figura 6.</b> Frascos Gerber® con cada una de las dietas con 25 larvas (izquierda), unidad experimental (derecha).....	72
<b>Figura 7.</b> Charola de bioensayo con larvas de primer instar en tres dietas artificiales.....	72
<b>Figura 8.</b> Procedimiento para obtener la harina de rizoma de maguey liofilizado.....	75
<b>Figura 9.</b> Dieta nueve con mezcla del colorante safranina.....	76
<b>Figura 10.</b> Peso promedio de 25 larvas de <i>Comadia redtenbacheri</i> obtenidas en plantas de magueyes, evaluadas cada 20 días.....	78
<b>Figura 11.</b> Peso de promedio de larvas de primer instar alimentadas con las tres dietas y evaluadas cada 20 días.....	79
<b>Figura 12.</b> Larvas emergidas en laboratorio alimentadas en las tres dietas, observadas a los 60 días.....	80
<b>Figura 13.</b> Formación de galerías por larvas de primer instar.....	81
<b>Figura 14.</b> Formación de galerías de larvas de primero y quinto instar en la dieta nueve.....	83
<b>Figura 15.</b> Larvas blancas de quinto instar, en dieta nueve.....	84
<b>Figura 16.</b> Larvas alimentadas con safranina después de 30 días.....	86

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO 1

<b>Cuadro 1.</b> Sexo de los insectos capturados en tres períodos en Teotihuacán, Estado de México.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Sexo de los insectos capturados en tres períodos en Otumba, Estado de México.....	17

### CAPÍTULO 2

<b>Cuadro 1.</b> Análisis de la Varianza de las áreas del compuesto Z5-14:Ac, obtenidas con las técnicas de extracción con hexano y de MEFS modo directo, ensayos con una glándula (n = 7).....	54
<b>Cuadro 2.</b> Análisis de la Varianza de las áreas del compuesto Z9-14:Ac, obtenidas con las técnicas de extracción con hexano y de MEFS modo directo, ensayos con una glándula (n = 7).....	55

### CAPÍTULO 3

<b>Cuadro 1.</b> Ingredientes y cantidades para elaborar dietas artificiales para <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	66
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de larvas de <i>Comadia redtenbacheri</i> utilizadas para evaluar las diferentes dietas artificiales.....	69
<b>Cuadro 3.</b> Dietas artificiales para evaluar la cría de <i>Comadia redtenbacheri</i> con diferentes ingredientes y cantidades.....	74

## INTRODUCCIÓN GENERAL

A través de la historia se han consumido insectos como alimento, actividad conocida como entomofagia, que tradicionalmente se ha practicado y propuesto como una solución para combatir la escasez de alimentos y que podría hacer importantes contribuciones a las necesidades nutricionales humanas (Belluco *et al.* 2015). Se han reportado más de 2000 especies de insectos considerados comestibles en todo el mundo. (Kouřimská y Adámková 2016).

Se considera a los insectos como alimento debido a su alto valor nutritivo, contenido de grasas, proteínas (aminoácidos como la metionina, cisteína, lisina y treonina vitaminas (vitamina A, complejo B y C), carbohidratos, fibras y minerales (calcio, hierro, zinc y fósforo), mismos que pueden variar por la amplia gama de especies. Un ejemplo es *Tenebrio molitor* L. con alta composición de ácidos grasos insaturados como omega-3 y seis ácidos grasos en algunas harinas, así como alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales similares a la carne de pescado, de res y cerdo (Ramos-Elorduy *et al.* 1997, Bukkens 2005, Johnson, 2010, Xiaoming , 2010, van Huis *et al.* 2013,

Kouřimská y Adámková 2016).

En general los órdenes de insectos que se consumen con mayor frecuencia son: 1) Coleoptera, 2) Lepidoptera, 3) Hymenoptera 4) Orthoptera 5) Hemiptera, 6) Isoptera, 7) Odonata y 8) Diptera (Pal and Roy 2014).

En México se consumen insectos de diferente especies, entre otros, el gusano blanco de maguey (*Aegiale hesperiaris* Walker), gusano rojo de maguey (*Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt), escamoles (*Liometopum apiculatum* Mayr y *L. occidentale var. luctuosum* Wheeler), chapulines (*Sphenarium histrio* Gerstaecker, *S. purpurascens* Charpentier, *S. magnum* Márquez, *Melanoplus femurrubrum* DeGeer y *M. mexicanus* Sauss), jumil sagrado (*Edessa cordifera* Walker), jumil de Morelos (*Euschistus sulcatus* Rolston), ahuahutle y axayacatl (*Buena af. margaritacea* Bueno, *Corisella edulis* Champion y *Corisella mercenaria* Say.), chicanas (*Atta mexicana* Smith, *A. cephalotes* Linneo y *A. texana* Buckley) y abejas sin aguijón (*Melipona beecheii* Bennett y *Scaptotrigona mexicana* Guérin) (Ramos-Elorduy *et al.* 2006).

Se han identificado 67 especies de lepidópteros que se consumen en su estadio larvario en 17 estados de México y que corresponden a las familias Arctiidae, Bombycidae, Castniidae, Cossidae, Geometridae, Hepialidae, Hesperidae, Lasiocampidae, Noctuidae, Nymphalidae, Papilionidae, Pieridae, Pyralidae, Saturniidae, Sesiidae, Sphingidae, Saturniidae, Pieridae, Noctuidae y Nymphalidae (Ramos-Elorduy *et al.* 2011).

La mayoría de las especies de insectos comestibles son colectadas de la naturaleza y por la alta demanda están siendo amenazadas debido a la sobreexplotación y la degradación de su hábitat. Esta pérdida es la primera causa de extinciones de insectos, acompañada por la introducción de organismos invasores, contaminación ambiental y control biológico, y muchas de las amenazas son sinérgicas. Investigaciones recientes sobre la conservación de insectos han dilucidado algunos principios básicos para el manejo de la conservación (Samways 2007, van Huis 2015).

Para lograr una cría exitosa de insectos es importante considerar su biología, control de las condiciones y la formulación de dieta. Sin embargo, existen otras problemáticas para lograr la cría en cautiverio de insectos, como son los sistemas de producción que son caros, y si se considera la cría a escala industrial se requiere de procesos de automatización para hacer que sean económicamente competitivos (van Huis 2013).

Con este antecedente, la presente investigación se centró en un insecto considerado comestible y con importancia económica y gastronómica, que se consume en su etapa larvaria. Su hospedante natural es *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck y para su extracción de la planta se acostumbra sacar totalmente el tallo subterráneo a la superficie, lo que ocasiona disminución de agaves en las zonas de colecta intensiva de las larvas. Por ello este estudio tuvo como objetivo registrar la fluctuación poblacional de adultos en campo, identificar los compuestos volátiles de la feromona de hembras y criar a la fase larvaria de *Comadia redtenbacheri* en una dieta meridica.

## LITERATURA CITADA

- Belluco, S. C. M., Losasso C., Maggioletti M., Alonzi C., Ricci C., and Paoletti M. G. 2015. Edible insects: a food security solution or a food safety concern? *Animal Frontiers*, 5: 25-30.
- Bukkens, S. G. F. 2005. Insects in the human diet: nutritional aspects. pp. 545-577. *In: Paoletti, M.G. Ed. Ecological Implications of Minilivestock; Role of Rodents, Frogs, Snails and Insects for Sustainable Development. New Hampshire, USA, Science Publishers.*
- Johnson, V. D. 2010. The contribution of edible forest insects to human nutrition and forest management. pp. 5-23. *In: Durst, P. B., Johnson, D. V., Leslie, R. L. and Shono K. (Eds.), Edible Forest Insects Humans Bite Back. Proceedings of workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development. Bangkok, Thailand, FAO, Regional Office for Asia and the Pacific.*
- Kouřimská, L., and Adámková, A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, 4: 22-26.
- Pal, P., and Roy S. 2014. Edible insects: future of human food - A review. *International Letters of Natural Sciences*, 21: 1-11.
- Ramos-Elorduy, J., Pino M., J. M., Escamilla P. E., Alvarado P. M., Lagunez O. J., and Ladrón de G., O. 1997. Nutritional value of edible insects from the State of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10: 142-157.
- Ramos-Elorduy, J., Pino M. J., and Conconi, M. 2006. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 45: 291-318.
- Ramos-Elorduy, J., Moreno J. M. P., Vázquez A. I., Landero I., Olieva-Rivera H., and Camacho V., H. M. 2011. Edible Lepidoptera in Mexico: geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7: 1-22.
- Samways, J. M. 2007. Insect conservation: A synthetic management approach. *Annual Review of Entomology*, 52: 465-487.

- van Huis, A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58: 563-83.
- van Huis A., Itterbeek, J. V., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir G., and Vantomme, P. 2013. *Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Rome. 187 p.
- van Huis A. 2015. Edible insects contributing to food security? *Agriculture and Food Security*, 4: 1-9.
- Xiaoming, C., Ying F., Hong Z., and Zhiyyong, C. 2010. Review of the nutritive value of edible insects. pp. 85-92. *In*: Durst, P. B., Johnson, D. V., Leslie, R. L. and K. Shono (eds.), *Edible Forest Insect Humans Bite Back*. Proceedings of workshop on Asia-Pacific Resources and their potential for development. Bangkok, Thailand, FAO, Regional Office for Asia and the Pacific.

## **Capítulo 1. Fluctuación poblacional de adultos de *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae)**

### **RESUMEN**

*Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) es un insecto de importancia económica y alimenticia, por lo que se busca implementar metodologías para su reproducción y manejo, para lo cual es indispensable el conocimiento de todos los estados de desarrollo. El objetivo fue monitorear el período de emergencia y determinar la fluctuación poblacional de adultos de *C. redtenbacheri* con diferentes trampas, en poblaciones nativas de su hospedero natural *Agave salmiana* en los municipios de Teotihuacán y Otumba, Estado de México. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante tres períodos para contabilizar los adultos. Se registraron los datos de temperatura y humedad relativa. De las trampas utilizadas, la de luz ultravioleta fue la que capturó adultos de *C. redtenbacheri*. Se determinó que el periodo de emergencia y fluctuación poblacional de los adultos en Teotihuacán duró en promedio 157 días y Otumba 137 días, durante los meses de diciembre a mayo, con una mayor emergencia a los 83 días en Teotihuacán y 74 días en Otumba. El número de hembras con respecto a machos fue diferente, con una proporción promedio de 1:15 para Teotihuacán y de 1:5 para Otumba. Las condiciones ambientales promedio que favorecieron la mayor emergencia en los tres períodos en Teotihuacán fueron de 17.7 °C de temperatura y 39.3% de humedad relativa, y para Otumba de 16.9 °C y 43.7%. Tanto el conocimiento del periodo de emergencia de los adultos, como la influencia de la temperatura y la humedad relativa, son de importancia para el manejo del insecto por parte de los productores y recolectores.

**Palabras clave:** Gusano rojo de maguey, emergencia de adultos, trampeo, luz ultravioleta, agave.

## **Population fluctuation of adults of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)**

### **Abstract**

*Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) is an insect of economic importance, and therefore, methodologies for its reproduction and management are sought for, for which it is indispensable the knowledge about all the stages of development. The objective was to monitor the period of emergency and determine the population fluctuation of adults of *C. redtenbacheri* with different traps, in native populations of its natural host *Agave salmiana* in the municipalities of Teotihuacán and Otumba, State of Mexico. The evaluations were carried out every week for three periods to count adults. Data of temperature and relative humidity were recorded. Of the traps used, ultraviolet light traps caught adults of *C. redtenbacheri*. It was determined that the population fluctuation of adults in Teotihuacan lasts, on average, 157 days, and in Otumba, 137 days, during the months of December to May, with the highest emergence at 83 days in Teotihuacan, and 74 in Otumba. The number of females with respect to males was different, with an average ratio of 1:15 for Teotihuacan and 1:5 for Otumba. The average environmental conditions that favoured the highest emergence in the three periods were 17.7 °C and 39.3% of relative humidity for Teotihuacan, and for Otumba they were 16.9 °C and relative humidity of 43.7%. Both, the knowledge of the emergence period of the adults and the influence of the temperature and relative humidity are important for the management of the insect by producers and gatherers.

**Keywords:** maguery redworm, adult emergence, trapping, ultraviolet light, agave.

## 1.1.INTRODUCCIÓN

El gusano rojo de maguey, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), es un insecto que tiene importancia económica y alimenticia. Este se distribuye en el Distrito Federal y los Estados de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Zacatecas, Estado de México y Veracruz; sus hospedantes principales son *Agave salmiana* Otto ex Salm., *Agave atrovirens* Karw. ex Salm-Dyck. y *Agave mapisaga* Trel. (Ramos-Elorduy *et al.* 2011).

Actualmente ésta especie es sobreexplotada debido a su alto valor comercial, lo que ha ocasionado la disminución tanto de sus poblaciones, como las de los agaves que lo hospedan, cuando estos son arrancados para extraer las larvas de rizomas y de raíces, y ya no son replantados por lo cual el maguey se muere, y esto a su vez ha motivado el interés para proteger y conservar este recurso natural a través de unidades de producción controladas (Ramos Elurdo *et al.* 2006). Para ese propósito se necesita información de sobre todo su ciclo biológico, pero solo se ha estudiado a su estado de larva en condiciones de laboratorio e invernadero (Hernández-Livera *et al.* 2005, Llanderal-Cázares *et al.* 2007, 2010).

La fase larvaria (Hernández-Livera *et al.* 2005), que se desarrolla dentro del rizoma de la planta del maguey durante cinco meses en invernadero o durante ocho meses, en campo. Desde que nace, se introduce en el rizoma de sus hospederas y solo sale de la planta para enterrarse en el suelo a unos 5 centímetros, formar su capullo y transformarse en pupa. Su periodo pupal dura de 3.5 a 4 meses (Llanderal-Cázares *et al.* 2007). Ahora hay información sobre aspectos de su biología y comportamiento (Miranda-Perkins *et al.* 2013), de organismos asociados (Zetina *et al.* 2009, 2012, Zetina y Llanderal 2014, Hernández-Flores *et al.* 2015), reproducción (Ramírez-Cruz y Llanderal-Cázares, 2015), de su morfología (Castro-Torres y Llanderal-Cázares 2015, 2016) y de la emergencia de sus adultos en condiciones de laboratorio (Miranda-Perkins *et al.* 2016). Sin embargo, la fluctuación poblacional y período de emergencia de adultos en su ambiente natural no ha sido estudiado y se desconocen factores asociados como temperatura y humedad relativa, que pueden influir en su emergencia y los que son importantes para la protección del estado adulto en el campo, así como para su eventual reproducción en un ambiente controlado. Yen (2012) menciona la falta de información que relacione a los diferentes estados de desarrollo con los adultos

correspondientes, lo que ha ocasionado confusión en la identidad de las especies, además de que la disponibilidad de un recurso en cuanto a su estacionalidad es de primordial interés para su manejo.

Existen diferentes métodos para muestrear poblaciones de insectos en campo que permiten monitorear el periodo de emergencia y fluctuación de poblaciones de insectos que tienen actividad nocturna. Uno de los más eficientes es la técnica de captura con trampas de luz. En la mayoría de los casos una sola trampa de luz es operada en o cerca del sitio de interés. A través de muestreos periódicos se puede detectar la presencia de plagas y obtener datos cuantitativos de su abundancia para pronosticar cambios poblacionales y su tendencia a largo plazo (Szentkirályi 2002). Las trampas de luz fueron desarrolladas para atrapar insectos de importancia médica (Burks *et al.* 1938), pero después han sido usadas para capturar insectos (Truman 1974) de diferentes órdenes (Coleoptera, Orthoptera, Isoptera, Dictyoptera) (Ramamurthy *et al.* 2010) y familias (Noctuidae, Geometridae, Drepanidae, Pyralidae) (Truxa y Fiedler 2012) entre otras.

Se puede explicar la respuesta positiva de las trampas de luz a que la mayoría de los insectos tienen dos tipos de órganos fotorreceptores: ocelos y ojos compuestos, éstos últimos conformados por un gran número de unidades fotosensibles denominadas omatidias que contienen paquetes de células fotorreceptoras, espectrales específicas para determinadas longitudes de onda, lo cual determina al rango de longitudes visibles para los insectos, el cual a menudo se expande a la región UV, que no es visible para el humano. La mayoría de insectos nocturnos son capaces de ver fuentes de luz que emiten grandes cantidades de radiación azul, verde y UV, por lo que son atraídos a este tipo de luz (Shimoda y Honda 2013, Sermisri y Torasa 2015), aunque en muchos casos es probable que puedan percibir la luz UV como un color único (Koshitaka *et al.* 2008).

La información de la época de emergencia del adulto del gusano rojo de maguey es indispensable para su detección, manejo y conservación en zonas de presencia del insecto. El objetivo del presente trabajo fue monitorear el período de emergencia y determinar la fluctuación poblacional de adultos de *C. redtenbacheri* en poblaciones nativas de *Agave salmiana* en los municipios de Teotihuacán y Otumba, Estado de México

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Área de estudio

Se eligieron zonas con poblaciones nativas de *A. salmiana*, en las cuales *C. redtenbacheri* es colectada de forma tradicional. Dicha zonas están situadas en los municipios de Teotihuacán y Otumba, Estado de México, el primero con coordenadas de 19° 42'07" de latitud norte, 98° 54'58" de longitud oeste, a una altitud de 2319 m, y Otumba a 19°39'6" latitud norte, 98°45'56" longitud oeste y altitud de 2480 m.

### 1.2.2. Tipos de trampas

#### 1.2.2.1. Tipo Delta

Estas trampas son utilizadas para el monitoreo y detección de vuelo de muchos de especies de insectos de distintos lepidópteros. Está construida de polipropileno que soporta la intemperie, y un cartón con adhesivo que se coloca en la base de la trampa para la captura de los insectos (no se utilizó feromona porque no se contaba con ella). La colocación de la trampa consiste en abrirla hasta que la parte de la base quede plana y en el fondo de esta se deposita un cartón con adhesivo, después se doblan las lengüetas laterales hacia adentro de las ranuras, se cierran los laterales y por último se cuelgan sobre el cultivo por medio de un alambre que vienen incluido en las trampas, en este caso fue en pencas de magueyes (Figura 1). Se colocaron 24 trampas tipo Delta de la empresa Ferosistemas<sup>®</sup>, a una distancia de 25 metros entre ellas y a 1.5 m de altura.



**Figura 1.** Trampa tipo Delta en penca de maguey

#### ***1.2.2.2. Tipo Funnel®***

Las trampas clásicas tipo Funnel son utilizadas para la captura masiva y monitoreo de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Estas son fabricadas con un polímero de plástico contra rayos ultravioleta y tienen una vida útil que oscila entre los seis a siete años.

Se colocaron dos trampas (Figura 2) integradas por cuatro piezas: 1) La tapa superior, que evito la entrada de agua al recipiente 2) El embudo, cuyo diseño facilitó la entrada de insectos y a la vez evitó que se escaparan, 3) El recipiente colector donde se puso 0.5 L de anticongelante marca bardahl® para la captura de los insectos y 4) un soporte, donde se anclo el cestillo donde va la feromona, al centro de la tapa, donde se colocó el septo con la feromona del Cossidae *Zeuzera pyrina* L. Las trampas se colocaron a 50 m de distancia entre ellas.



**Figura 2.** Trampa tipo Funnel.

### ***1.2.2.3. Trampa con luz UV***

Se utilizaron dos trampas de luz ultravioleta en cada sitio de estudio debido a su alto costo. Las trampas de luz ultravioleta (Figura 3), diseñadas y modificadas a partir del tipo Pensilvania<sup>®</sup> (Frost 1957) por ITRAP<sup>®</sup>, se colocaron a 50 m de distancia una de otra y a 1.25 m de altura sobre el nivel del piso. Constan de cuatro deflectores de acrílico montados a 90° entre uno y otro, para sostener en el centro una lámpara que, en el caso de este estudio, fue de luz led. El recipiente de captura fue un embudo de plástico soportado por un tubo de policloruro de vinilo (pvc) y una cubeta recolectora a la que se le adicionó 1.5 litros de anticongelante bardahl<sup>®</sup> para la conservación de los insectos capturados. El soporte para anclar la trampa al suelo fue de tres tubos de acero inoxidable atornillados al embudo. El sistema eléctrico de las trampas funcionó con la energía que proviene de un panel solar de 10 w (Enesol<sup>®</sup> modelo DS-A18-10, Estado de México) que alimento a una batería recargable de litio de 12 voltios, y que controla la carga de energía suficiente para las horas de luz, para funcionar en el periodo de oscuridad.



**Figura 3.** Trampa de luz ultravioleta

### **1.2.3. Captura de insectos**

La emergencia de *C.redtenbacheri* se contabilizó en tres períodos en Teotihuacán: 1) diciembre de 2013 a diciembre de 2014, 2) diciembre de 2014 a diciembre de 2015 y 3) diciembre de 2015 a junio de 2016 mientras que en Otumba el muestreo se hizo en los dos últimos períodos mencionados. Los muestreos se realizaron cada ocho días desde que se estableció el experimento.

En las trampas tipo Delta® él muestreo consistió en cambiar los adhesivos y sustituirlos por nuevos en cada revisión. Cada adhesivo se llevó al laboratorio Fisiología de Insectos, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México para identificar la presencia de adultos de *C. redtenbacheri*.

En las trampas tipo Funnel y de luz ultravioleta se filtró el anticongelante y los insectos se conservaron en frascos con alcohol etílico 70%. Cada muestra se llevó al laboratorio, donde se colocaron sobre papel absorbente para secarlos (Figura 4) y separar los adultos de *C. redtenbacheri* de las otras especies de insectos capturados.



**Figura 4.** Secado de adultos de *Comadia redtenbacheri*

Para la identificación de adultos se usó la clave taxonómica de Triplehorn y Johnson (2005). La separación de sexos se hizo con base en el tipo de antenas: aserradas en hembras y bipectinadas en machos (Figura 5). De igual manera se corroboraron los caracteres morfológicos del adulto con lo reportado por Castro-Torres y Llanderal-Cázares (2015).



**Figura 5.** Dimorfismo de antenas en hembra (izquierda) y macho (derecha) de *Comadia redtenbacheri*

#### **1.2.4. Temperatura y humedad relativa de los lugares de estudios**

Se obtuvieron datos de temperatura y humedad relativa con la ayuda de un DataLogger RHT10 versión 5.0 (EXTECH® Massachusetts, EUA), colocado en cada lugar de muestreo.

El instrumento fue programado para registrar la temperatura cada dos horas. Con los datos obtenidos se obtuvo el promedio por día y por semana, durante cada periodo de la fluctuación poblacional de adultos de *C. redtenbacheri*.

### **1.2.5. Análisis estadístico**

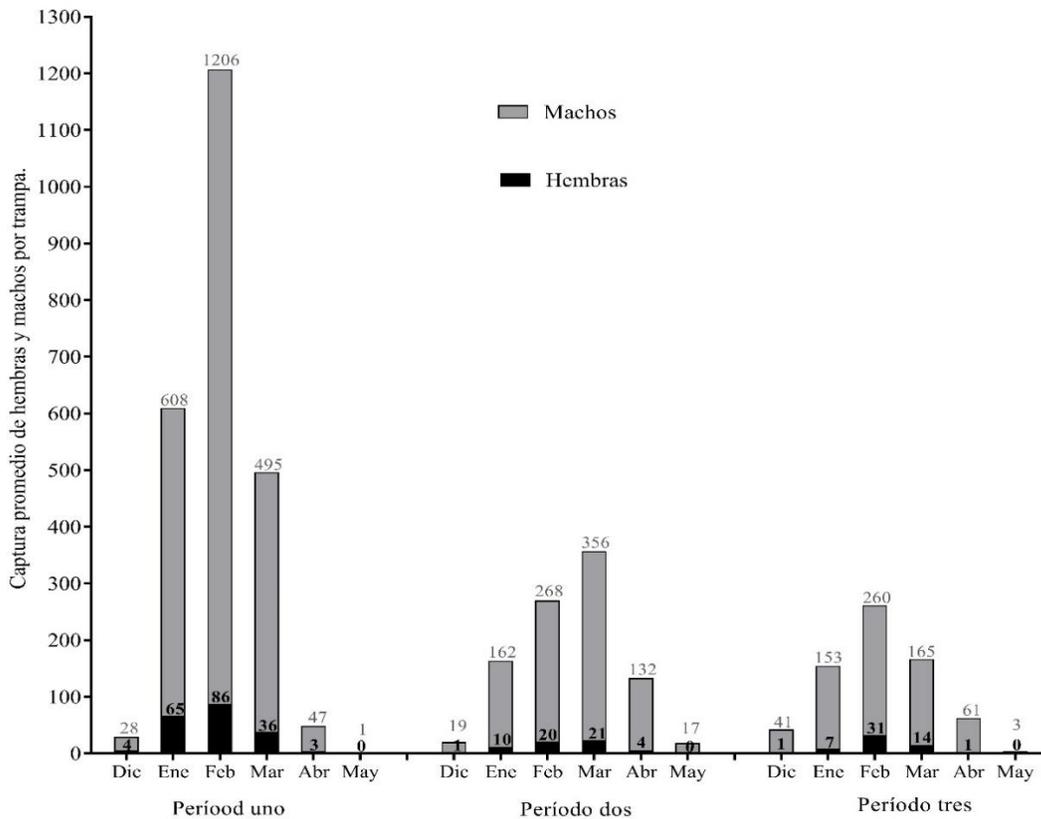
Se realizó un análisis de varianza conforme a un diseño experimental completamente al azar, con los datos de captura de *C. redtenbacheri* de los periodos evaluados. Y una comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Con los datos de temperatura, humedad relativa e insectos capturados se hizo un análisis multivariado usando el coeficiente de correlación de Pearson ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con el paquete SAS (SAS Institute, 2015).

## **1.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

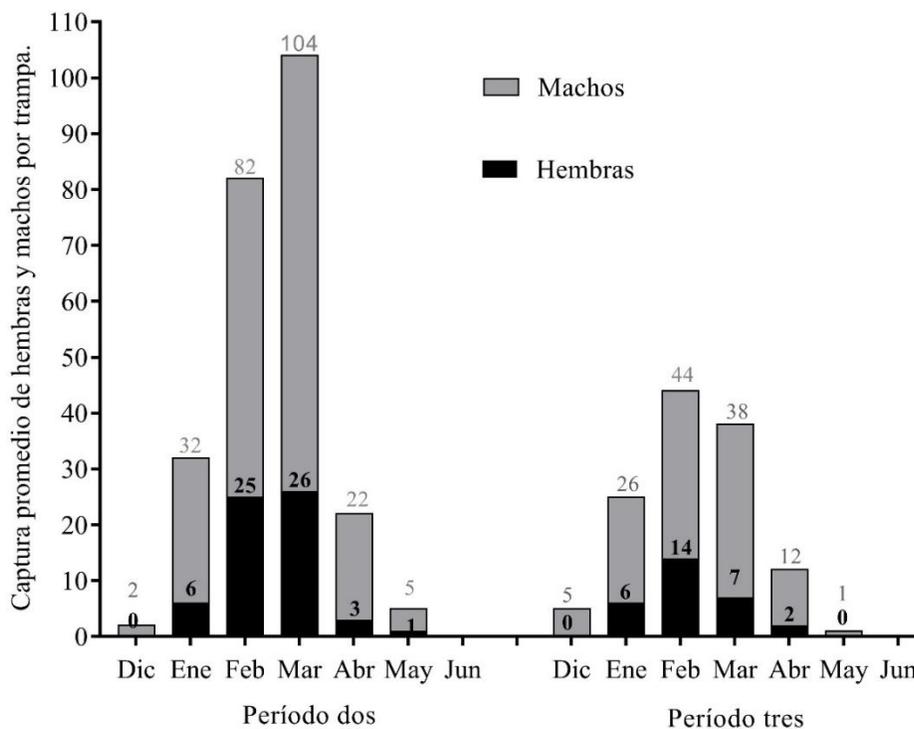
De los tres tipos de trampa que se usaron, solo en la de luz ultravioleta hubo captura de adultos de *C. redtenbacheri* en los dos sitios de estudio. La respuesta al tipo de trampa está relacionada con la eficacia de este tipo de luz UV, ya que se ha comprobado que un gran número de insectos nocturnos pueden percibir radiación de luz UV preferentemente en la región cercana a los 320-380 nanómetros (Truman 1974, Shimoda and Honda 2013). El uso de trampas con luz UV ha sido exitoso para varias especies de insectos, principalmente plagas agrícolas y forestales (Szentkirályi 2002, Sermsri y Torasa 2015).

En Teotihuacán la época de emergencia de adultos de *C. redtenbacheri* en los tres periodos de evaluación fue similar, ya que se presentó de diciembre a mayo y duró en promedio 157 días. En el primer periodo ocurrió del 23 de diciembre de 2013 al 05 de mayo de 2014, en el segundo del 01 de diciembre de 2014 al 25 de mayo de 2015 y en el tercero del 30 de noviembre de 2015 al 09 de mayo de 2016 (Figura 6). La mayor emergencia se presentó en el mes de febrero para el primero y tercer periodo, y en marzo en el segundo periodo, desfase que pudiera deberse a que en el mes de febrero de este periodo, hubo baja temperatura y alta humedad relativa.



**Figura 6.** Captura promedio de hembras y machos de los tres períodos evaluados en Teotihuacán.

Para los períodos de fluctuación poblacional de adultos de *C. redtenbacheri* en el Municipio de Otumba fue de diciembre a mayo con 137 días promedio. El primer periodo ocurrió del 22 de diciembre de 2014 al 25 de mayo de 2015, y para el segundo del 21 de diciembre de 2015 al 02 de mayo de 2016 (Figura 7). La mayor emergencia se presentó en el mes de marzo para el periodo dos y febrero en el periodo tres. Los días promedio de fluctuación poblacional de esta especie son mayores a los encontrados en laboratorio (Miranda *et al.* 2013), quienes reportan un total de 49 días.



**Figura 7.** Captura promedio de hembras y machos de los dos períodos evaluados en Otumba.

En los dos sitios de estudio y en los períodos evaluados, hubo captura de adultos de *C. redtenbacheri* entre los meses de diciembre a mayo. El periodo de emergencia de adultos y fluctuación poblacional difiere a los encontrados por Llanderal-Cázares *et al.* (2007) en esta misma especie, quienes lo reportan en la primera semana de enero en condiciones de campo y a principios de abril a la tercera semana de mayo en condiciones de laboratorio (Miranda-Perkins *et al.* 2016).

La máxima emergencia promedio de adultos durante la fluctuación poblacional en Teotihuacán fue a los 85 días (tres períodos), mientras que en Otumba fue a los 74 días (dos períodos). Estos valores son diferentes a los encontrados en condiciones de laboratorio, donde la máxima emergencia de adultos fue entre los 19 y 20 días (Miranda-Perkins *et al.* 2016).

El número de hembras siempre fue menor en todos los períodos en ambas áreas de estudio. En Teotihuacán se observó variación en el número de adultos capturados según su

sexo en los tres períodos de muestreo, con promedio de 7% para hembras y 93% para machos, con diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Sexo de los insectos capturados en tres períodos en Teotihuacán, Estado de México.

<b>Período</b>	Medias $\pm$ S.E Hembras	Medias $\pm$ S.E machos	Total de hembras	Total de machos
1	7.24 $\pm$ 0.78 a	88.37 $\pm$ 9.57 a	391	5163
2	2.09 $\pm$ 0.78 b	35.37 $\pm$ 9.57 b	113	2023
3	3.99 $\pm$ 0.78 b	25.37 $\pm$ 9.57 b	110	1480
DS	6.18	75.18		
F	14.84	12.52		
Pr	<.0001	<.0001		
DF	161	161		

S.E: Error estándar, DS: Desviación estándar, F: F calculada, Pr: Probabilidad, DF: Grados libertad. Medias (LSD) con la misma letra son estadísticamente iguales ( $\alpha$ , 0.05). n= 162.

En Otumba los resultados obtenidos fueron similares a los de Teotihuacán, pues las capturas promedio de ambos períodos fueron de 19% de hembras y 81% de machos. Hubo diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en el número de insectos capturados entre períodos y dependiendo del tipo de sexo (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Sexo de los insectos capturados en tres períodos en Otumba, Estado de México.

<b>Período</b>	Medias $\pm$ S.E Hembras	Medias $\pm$ S.E machos	Total de hembras	Total de machos
1	NM	NM	NM	NM
2	2.86 $\pm$ 0.55 a	11.71 $\pm$ 1.53 a	120	492
3	1.24 $\pm$ 0.55 b	5.93 $\pm$ 1.53 b	52	249
DS	3.62	10.30		
F	4.37	7.11		
Pr	<0.0397	<0.0092		
DF	83	83		

N.M: No medido, S.E. Error estándar, DS: Desviación estándar, F: F calculada, Pr: Probabilidad, DF: Grados de libertad. Medias (LSD) con la misma letra son estadísticamente iguales ( $\alpha$ , 0.05). n= 84.

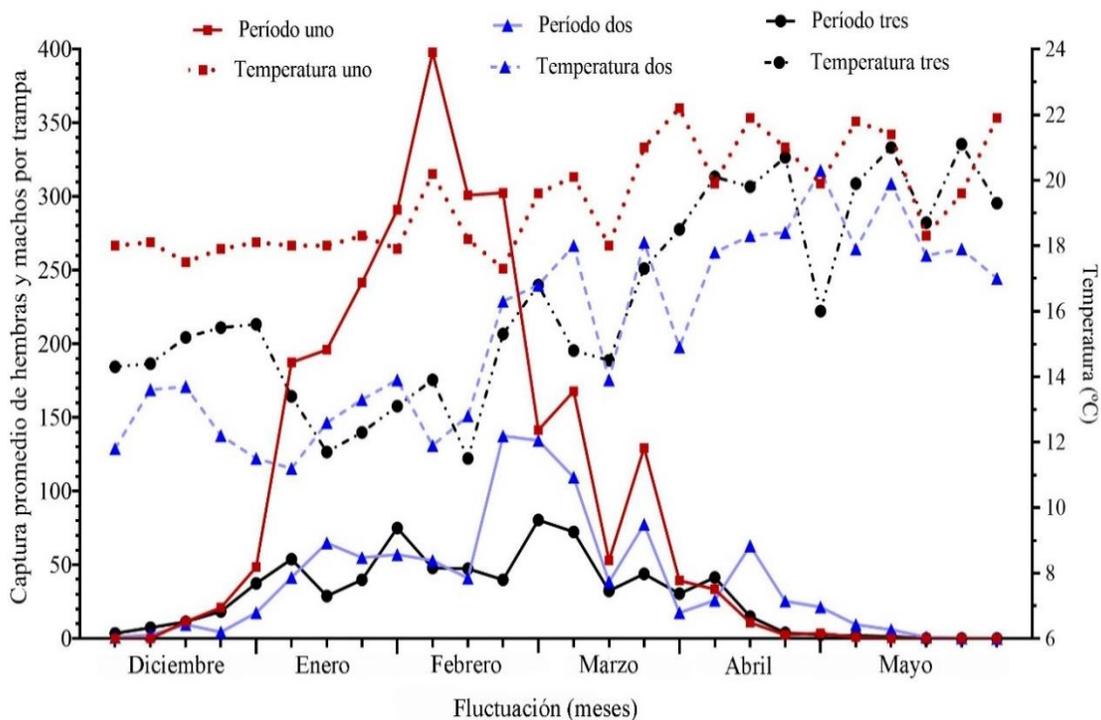
En ambas localidades se observó que hubo una reducción en el número total de insectos capturados a través de los períodos continuos de muestreo (Cuadro 1 y 2), lo que se podría atribuir a que el trampeo se llevó a cabo en las mismas parcelas de agaves de superficies pequeñas y las capturas sucesivas pudieron reducir la población del insecto.

Las proporciones sexuales de hembras con respecto a machos para cada periodo fue de: 1:13, 1:18 y 1:13 para Teotihuacán y para Otumba de 1:4 y 1:5, es evidente que la cantidad de captura de machos fue mayor que de hembras, sin embargo, en condiciones de laboratorio, Miranda-Perkins *et al.* (2016) observaron una proporción de sexos de 1:1, de esta misma especie. La menor captura de hembras de *C. redtenbacheri* en las trampas se atribuye a que tienen poca capacidad para volar, mientras que los machos vuelan en cuanto emergen, comportamiento similar a lo encontrado en la especie *P. robiniae* perteneciente a la misma familia del gusano rojo de maguey, donde los machos presentan un vuelo rápido en zigzag para encontrar a las hembras, mientras que ellas permanecen sobre el hospedante (Solomon y Neel (1973) Solomon (1976) indica que la proporción sexual es un indicador del tamaño y estabilidad de una población y observó que en el Cossidae *Prionoxystus robiniae* (Peck) fue relativamente estable de un año a otro, con un promedio de tres machos a dos hembras para tres años de muestreo y opina que la fluctuación anual en poblaciones de insectos con frecuencia está correlacionada con cambios en la relación de sexos, aunque es poca de un año a otro, lo que es un indicador de que las poblaciones tienden a mantener estable su proporción sexual.. En la mayoría de los insectos nocturnos el apareamiento es favorecido por una feromona que libera la hembra y que es captada por el macho (Uehara *et al.* 2015) y, tal como lo reportan Durán *et al.* (2004), en el cosido *Z. pyrina* se ha comprobado que cuando se usan trampas con una feromona sintética, los machos tienen mayor movilidad que las hembras y una escasa capacidad de desplazamiento dado lo voluminoso y abultado de su abdomen. Ramírez-Cruz y Llanderal-Cázares (2015) reportaron que la hembra de *C. redtenbacheri*, es proovigénica, ya que emerge con un promedio de 104 ovocitos maduros, listos para ser ovipositados, lo que limita su capacidad de vuelo.

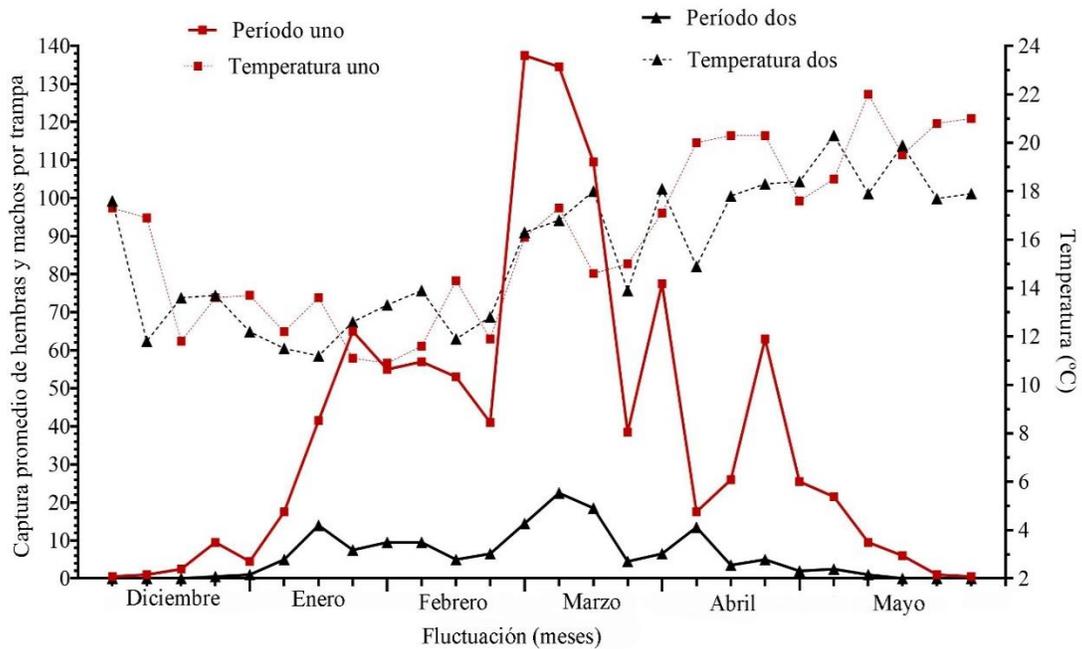
La variación en la emergencia de adultos de Comadia se atribuye a los cambios de temperatura y humedad del ambiente, esto también sucede en otras especies de insectos, como en *Ceratitis capitata* Wied. (Nyamukondiwa *et al.* 2013) donde las temperaturas

críticas afectaron su biología y la fluctuación poblacional. Y a pesar de que, se encuentra presente todo el año, su captura en trampas se incrementa en primavera y disminuye notablemente en invierno.

En todos los períodos evaluados y en las dos localidades se encontró que el número de insectos capturados tiene relación con la temperatura y la humedad relativa. Durante el primer periodo en Teotihuacán el mayor pico de emergencia de adultos fue cuando la temperatura alcanzó los 20.2 °C, mientras que en el segundo fue de 16.3 °C y de 16.8 °C en el tercero (Figura 8), lo que demuestra que la temperatura es favorable para la emergencia de *C. redtenbacheri* cuando se acerca a los 20 °C y desciende a menor temperatura. También en Otumba, la emergencia fue mayor cuando se incrementó la temperatura a 16.6 °C en el primer periodo y 17.3 °C en el segundo (Figura 9). Diversos autores han determinado que la temperatura es un factor abiótico que influye en la dinámica poblacional de insectos, con las particularidades para cada especie (Karuppaiah y Sujayanad 2012, García *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2013, Khaliq *et al.* 2014).

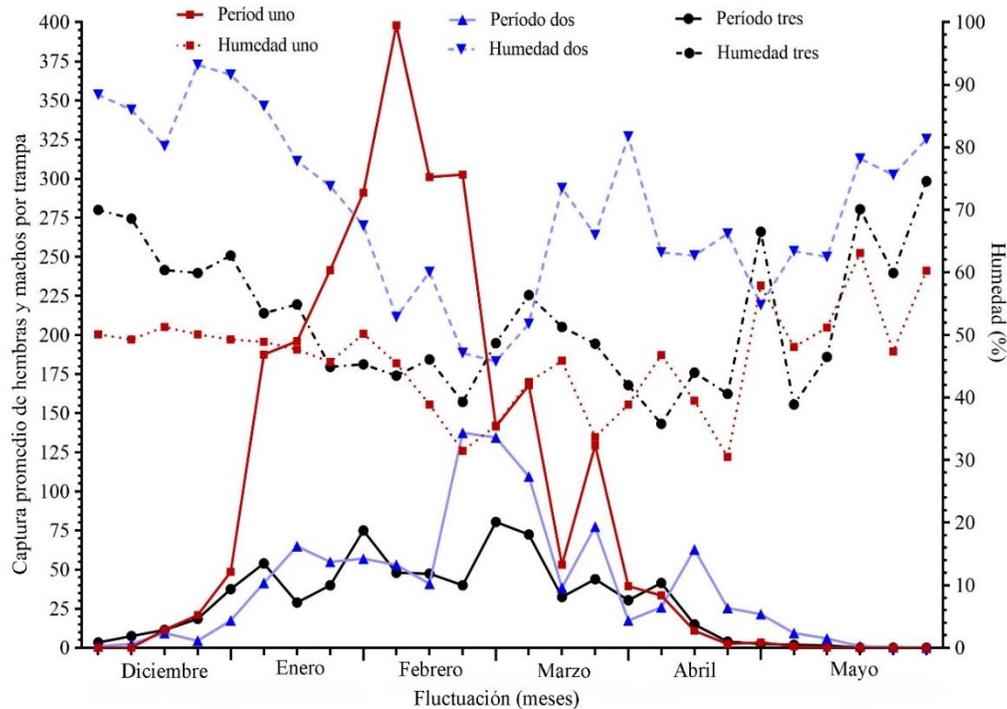


**Figura 8.** Fluctuación poblacional de adultos de *Comadia redtenbacheri* y temperatura media por semana en los tres períodos evaluados en Teotihuacán, Estado de México.



**Figura 9.** Fluctuación poblacional de adultos de *Comadia redtenbacheri* y temperatura en los dos periodos evaluados en Otumba, Estado de México.

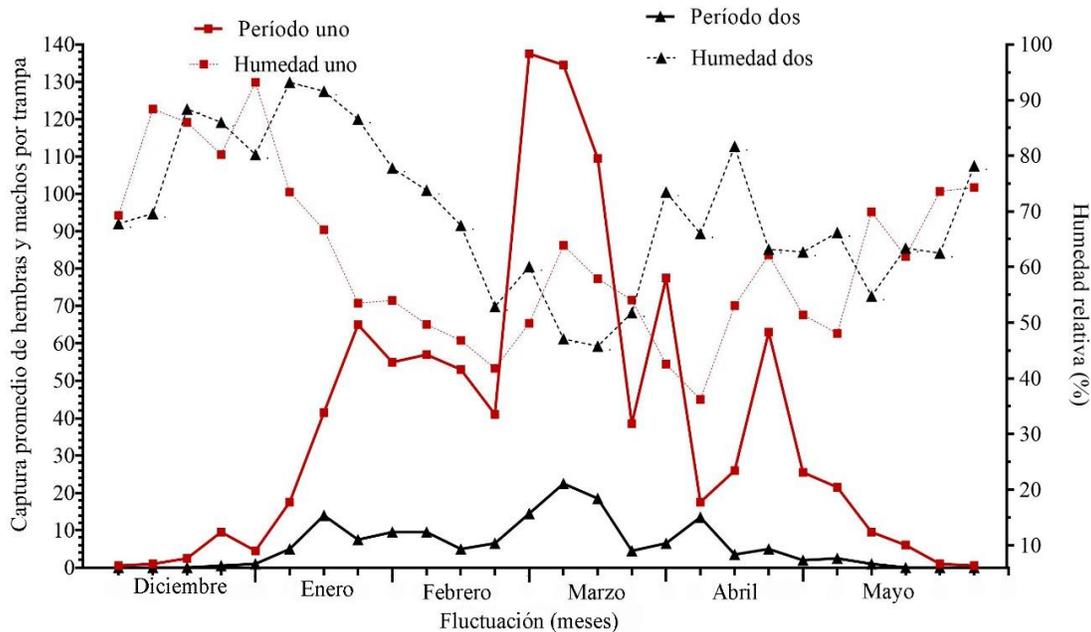
La humedad relativa ambiental media de cada periodo consecutivo durante la emergencia de adultos en Teotihuacán fue de: 46.6% para el primero, 70.6% segundo y 53.3% tercero, respectivamente, pero los mayores picos de emergencia en cada periodo coincidieron con los valores medios más bajos de humedad relativa, para cada periodo que fueron de 31.5% para el primero, 47.0% segundo y 39.3% tercer periodo (Figura 10).



**Figura 10.** Fluctuación poblacional de adultos de *Comadia redtenbacheri* y humedad relativa promedio por semana, en los tres períodos, en Teotihuacán.

En Otumba, en los dos períodos evaluados, la media de humedad relativa para el primer periodo evaluado fue de 71.2% y de 59.8 % para el segundo y durante la mayor emergencia de adultos en cada periodo fue de 45.6% para el primero y 41.8% para el segundo (Figura 11).

Mostrando que cuando hay menor humedad relativa, hay mayor número de insectos capturados, está relación también se presentó en esta especie en condiciones de laboratorio, cuando hubo menor humedad (Miranda-Perkins *et al.* 2013). En otras especies se sabe que factores abióticos pueden modificar e influir en la dinámica poblacional de insectos (Kumar *et al.* 2013) y que necesitan determinada humedad relativa para su óptimo desarrollo (Khaliq *et al.* 2014).



**Figura 11.** Fluctuación poblacional de adultos de *Comadia redtenbacheri* y humedad relativa en los dos períodos, en Otumba.

Al relacionar la población de adultos capturados de *C. redtenbacheri* con los promedios de temperatura y humedad (Figuras 10 y 11), mediante los coeficientes de correlación de Pearson en los meses de mayor emergencia (enero, febrero, marzo) de los tres años de evaluación en Teotihuacán, se encontró correlación estadísticamente significativa para la temperatura ( $r = 0.62$ ,  $P < 0.0001$ ) y la humedad relativa ( $r = -0.47$ ,  $P < 0.0001$ ), mientras que en Otumba fue ( $r = 0.28$ ,  $P < 0.0426$ ) para temperatura y ( $r = -0.34$ ,  $P < 0.013$ ) para humedad. La correlación de estos factores abióticos explica el comportamiento de la fluctuación poblacional de este insecto en los meses de emergencia en los dos municipios, es decir que, a mayor temperatura, mayor es la captura de adultos de *C. redtenbacheri* y viceversa y lo contrario sucede con la humedad relativa. La correlación entre estos dos factores se ha reportado con la misma tendencia en varios trabajos de fluctuación poblacional de diferentes especies (Ismail *et al.* 1992, Zulfiqar *et al.* 2010, Rangel *et al.* 2012).

## 1.4.CONCLUSIONES

La trampa de luz ultravioleta permitió el monitoreo del período de emergencia de adultos de *Comadia redtenbacheri* en los Municipios de San Juan Teotihuacán y Otumba, estado de México.

La emergencia de adultos de *Comadia redtenbacheri* se presentó de diciembre a mayo, durante 157 días promedio en Teotihuacán y 137 días promedio en Otumba. La mayor captura de insectos fue a finales del mes febrero y principios del mes de marzo, a los 83 días en Teotihuacán y 74 días para Otumba.

Se obtuvo la fluctuación poblacional en ambos municipios. No fue lineal, mostró variación en el número de insectos capturados. Existe correlación positiva entre el número de insectos capturados con la temperatura y correlación negativa con la humedad relativa del ambiente.

### Comentarios y recomendaciones

El conocimiento del periodo de emergencia de adultos por parte de los productores y recolectores es importante, ya que el cuidado y protección de esta especie en los meses de diciembre a mayo, época más vulnerable del insecto para su reproducción, permitirá la conservación e incremento de las poblaciones del insecto para su mejor aprovechamiento.

La atracción de adultos de *C. redtenbacheri* hacia trampas de luz ultravioleta también puede ser útil para conocer si en otros municipios o estados aún se encuentran poblaciones de este insecto y determinar su abundancia. La influencia de la temperatura y de la humedad relativa debe considerarse para el manejo del insecto en eventuales sistemas de producción.

## 1.5.LITERATURA CITADA

- Burks, B. D., Ross, H. H., and Frison, T. H. 1938. An economical, portable light for collecting nocturnal insects. *Journal of Economic Entomology* 31: 316-323.
- Castro-Torres, R. E., y Llanderal-Cázares, C. 2015. Principales caracteres morfológicos para el reconocimiento de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 2: 798-803.
- Castro-Torres, R., and Llanderal-Cázares, C. 2016. Detailed morphology of all life stages of the agave red worm, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae). *Neotropical Entomology* DOI 10.1007/s13744-016-0425-7.
- Durán J. M., Alvarado, M., González, M. I., Jiménez, N., Sánchez, A., y Serrano, A. 2004. Control del taladro amarillo, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera, Cossidae), en olivar mediante confusión sexual. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 30: 451-462.
- Frost, S. W. 1957. The Pennsylvania insect light trap. *Journal of Economic Entomology* 50: 287-292.
- García G. D., Sánchez, S. S., Romero, N. J., y Pérez, F. J., 2013. Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en limón persa (*Citrus latifolia*), en Huimanguillo, Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39: 201-204.
- Hernández-Flores, L., Llanderal-Cázares, C., Guzmán-Franco, A. W., and Aranda-Ocampo, S. 2015. Bacteria present in *Comadia redtenbacheri* larvae (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology* 52: 1150-1158.
- Hernández-Livera, R. A., Llanderal-Cázares C., Castillo-Márquez, L. E., Valdez-Carrasco, v., y Nieto-Hernández, R. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539-544.
- Ismail, I. I., Abou-Zeid, N. A., and F. F. Abdallah. 1992. Population dynamics of the leopard moth, *Zeuzera pyrina* L., and its control on olive trees in Egypt. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99: 519-524.
- Karuppaiah, V., and Sujayanad, G. K. 2012. Impact of climate change on population dynamics of insect pests. *World Journal of Agricultural Science* 8: 240-246.

- Khaliq, A., Javed, M., Sohail, M., and Sagheer, M. 2014. Environmental effects on insects and their population dynamics. *Jurnal of Entomology and Zoology Studies*. 2: 1-7.
- Koshitaka, H., Kinoshita, M., Vorobyev, M., and Arikawa, K. 2008. Tetrachromacy in a butterfly that has eight varieties of spectral receptors. *Proceeding of the Royal Society B*. 275: 947-954.
- Kumar, S., Sidhu, J. K., Hamm, J. C., Kular, J. S., and Mahal, M. S. 2013. Effects of temperature and relative humidity on the life table of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on cotton. *Florida Entomologist* 96: 19-28.
- Llanderal-Cázares, C., De los Santos-Posadas, H. M., Almanza-Valenzuela, I., Nieto-Hernández, R., and Castillejos-Cruz, C. 2010. Establecimiento del gusano rojo de maguey en invernadero. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 26: 25-31.
- Llanderal-Cázares, C., Nieto-Hernández, R., Almanza-Valenzuela, I., and Ortega-Álvarez, C. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6: 252-255.
- Miranda-Perkins, K., Llanderal-Cázares, C., De los Santos-Posadas, H. M., Portillo-Martínez, L., and Viguera-Guzmán, A. L. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist* 96: 1424-1433.
- Miranda-Perkins, K., Llanderal-Cázares, C., Cadena-Barajas, M., and López-Sauceda, J. 2016. Adult emergence and reproductive behavior of *Comadia redtenbacheri* in confinement. *Southwestern Entomologist* 41: 657-665.
- Nyamukondiwa, C., Weldon, C. W., Chown, S. L., le Roux, P. C., and Terblanche, J. S. 2013. Thermal biology, population fluctuations and implications of temperature extremes for the management of two globally significant insect pests. *Journal of Insect Physiology* 59: 1199-1211.
- Ramamurthy, V. V., Akhtar, M. S., Patankar, N. V., Menon, P., R. Kumar, S. K. Singh, S. Ayri, S. Parveen, and V. Mittal. 2010. Efficiency of different light sources in light traps in monitoring insect diversity. *Journal Munis Entomology & Zoology* 5: 109-114.
- Ramírez-Cruz, A., and Llanderal-Cázares, C. 2015. Morfología del sistema reproductor de la hembra de *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae). *Acta Zoológica Mexicana. (n. s.)* 31: 431-455.

- Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Vázquez, A. I., Landero, I., Oliva-Rivera, H., and Camacho, V. H. M. 2011. Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 7: 2-22.
- Rangel, R., Pérez, M., Sánchez, S., and Capello, S. 2012. Fluctuación poblacional de *Xyleborus ferrugineus* y *X. affinis* (Coleoptera: Curculionidae) en ecosistemas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*. 60: 1577-1588.
- SAS. 2015. Statistical Analysis System. Copyright© SAS Institute Inc., versión 9.4. Cary, North Carolina, USA.
- Sermisri, N., and Torasa, C. 2015. Solar energy-based insect pest trap. *Procedia-Social and Behavioral Sciences* 197: 2548-2553.
- Shimoda, M., and Honda, K. 2013. Insect reactions to light and its applications to pest management. *Applied Entomology and Zoology* 48: 413-421.
- Solomon, J. D. 1976. Sex ratio of the carpenterworm moth (*Prionoxystus robiniae*) (Lepidoptera: Cossidae). *The Canadian Entomologist* 108: 317-318.
- Solomon, J. D., and Neel, W. W. 1973. Mating behavior in the carpenterworm moth, *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae). *Annals of the Entomological Society of America* 66: 312-314.
- Szentkirályi, F. 2002. Fifty-year-long insect survey in Hungary: T. Jermy's contributions to light-trapping. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 48: 85-105.
- Triplehorn, C. A., and Johnson, N. F. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA., USA.
- Truman, E. 1974. Summary of investigations of electric insect traps. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin N° 1498. Washington, D.C., USA.
- Truxa, C., and Fiedler, K. 2012. Attraction to light-from how far do moths (Lepidoptera) return to weak artificial sources of light? *European Journal of Entomology* 109: 77-84.
- Uehara, T., Naka, H., Matsuyama, S., Ando, T., and Honda, H. 2015. Identification of the sex pheromone of the diurnal hawk moth, *Hemaris affinis*. *Journal of Chemical Ecology* 41: 9-14.

- Yen, A. L. 2012. Edible insects and management of country. *Ecological Management & Restor* 13: 97-99.
- Zetina, D. A. H., Llanderal-Cázares, C., Ruíz, C. E., and Khalaim, A. I. 2009. Registro para México de *Lissonota fascipennis* Townes (Hymenoptera: Ichneumonidae), como parasitoide del gusano rojo del maguey. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 25: 655-657.
- Zetina, D. A., Llanderal, C., and Huerta, H. 2012. *Acantholespesia texana* (Aldrich & Webber): A new report for Mexico, as a parasitoid of *Comadia redtenbacheri* Hamm. *Southwestern Entomologist* 37: 235-237.
- Zetina, D. A., and C. Llanderal. 2014. Signs and symptoms in *Comadia redtenbacheri* Hamm. (Lepidoptera: Cossidae) larvae affected by parasitoids. *Southwestern Entomologist* 39: 285-290.
- Zulfiqar, M. A., Sabri, M. A., Raza, M. A., Hamza, A., Hayat, A., and Khan, A. 2010. A. Z., A. S. Muhammad, A. R. Muhammad, H. Amir, H. Asim, and K. Ahsan. 2010. Effect of temperature and relative humidity on the population dynamics of some insect pests of maize. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences* 8: 16-18.

## Capítulo 2. Feromona sexual de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)

### Resumen

*Comadia redtenbacheri* es un insecto originario de México y tiene importancia cultural, alimenticia y económica. El objetivo de esta investigación fue identificar los componentes de la feromona sexual de *C. redtenbacheri*. Las técnicas utilizadas para extraer los compuestos feromonales fueron disolvente orgánico y microextracción en fase sólida, en modo directo, con hembras vivas y calentado de glándulas. Los ensayos se realizaron al momento que las hembras expusieron el ovipositor, éstas fueron tomadas de su jaula para colocarlas en los viales HS o para cortarles el ovipositor según la prueba a realizar (hembras de dos días de nacidas). Con las diferentes técnicas de extracción de volátiles se identificaron dos compuestos (Z)-5-Tetradecen-ol-acetato y (Z)-9-Tetradecen-ol-acetato, con una proporción de 3.8:1. La identificación de cada analito se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de masas con los de su estándar correspondiente. La mejor técnica de extracción de compuestos volátiles fue la microextracción en fase sólida con hembras vivas, seguida del modo directo, calentado y disolvente orgánico.

**Palabras clave:** Microextracción en fase sólida, (Z)-5-Tetradecen-ol-acetato, (Z)-9-Tetradecen-ol-acetato.

## **Sexual pheromone of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)**

### **Abstract**

*Comadia redtenbacheri* is an insect native to Mexico, and it has cultural, alimentary and economical importance. The objective of this research was to identify the components of the sexual pheromone of *C. redtenbacheri*. The techniques used to extract pheromone components were organic solvent and Solid Phase Micro-extraction, directly, with living females, and gland heating. The assays were carried out when females exposed the ovipositor; these were taken out of the cage to be placed in HS vials or to cut their ovipositor, according to the test to be carried out (two-day old females). With the different volatile extraction techniques two compounds were identified: (z)-5-Tetradecen-ol-acetate and (Z)-9-tetradecen-ol-acetate, with a ratio of 3.8:1. The identification of each analyte was performed comparing the retention time and the mass spectrum with those of their respective standards. The best extraction technique for volatile compounds was Solid Phase Micro-extraction technique with living females, followed by direct mode, heating and organic solvent.

**Keywords:** Solid Phase Micro-extraction, (Z)-5-Tetradecen-ol-acetate, (Z)-9-Tetradecen-ol-acetate.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

La única especie del género Cossidae conocida en México (Brow 1975) es el gusano rojo del maguey, *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt, siendo su hospedante natural el *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dick (Ancona 1930) en el que se desarrolla en su estado larvario. Esta es una especie comestible en México y aporta hasta el 29% de su peso como proteína (Ramos-Elorduy *et al.* 1998, Ramos *et al.* 2012). En las zonas de producción, las larvas tienen importancia cultural, alimenticia, económica e, incluso, de identidad como en las botellas de mezcal donde se añaden como sello estético. La sobre-explotación debido a la alta demanda de este insecto para su consumo ha provocado que se encuentre amenazado en las áreas de colecta intensiva, lo que obliga a la conservación de este recurso único en México (Ramos-Elorduy *et al.* 2006).

No existen crías de gusano rojo del maguey en cautiverio por lo que el monitoreo de la emergencia de sus adultos en campo es indispensable para su manejo planificado y adecuada conservación. Aprovechando que esta especie es de hábitos nocturnos como otros lepidópteros, se han empleado trampas de luz para realizar la captura de adultos; no obstante, este tipo de trampas no es específica para esta especie, por lo cual capturan también a otros insectos no objetivo (Ramamurthy *et al.* 2010) y que pueden tener funciones relevantes en los ecosistemas naturales donde *C. redtenbacheri* está presente.

Bajo la hipótesis de que la feromona sexual de la hembra de *C. redtenbacheri*, puede ser una herramienta eficiente para la detección y monitoreo de adultos de esta especie, como sucedió con *Zeuzera pyrina* (L) (Almanoufi *et al.* 2012). Además de que ya se conoce el procedimiento para el aislamiento e identificación de los componentes feromonales de varias especies de Cossidae, tales como: *Prionoxystus robiniae* Peck (Solomon *et al.* 1972), *Cossus cossus* L. (Capizzi *et al.* 1983), *Cossus mongolicus* Ersch (Qi *et al.* 1990), *Holcocerus insularis* Staudinger (Zhang *et al.* 2001), *Holcocerus hippophaecolus* Hua (Fang *et al.* 2005), *Holcocerus artemisiae* Hua (Zhang *et al.* 2009), *Isoceras sibirica* Alpheraky (Zhang *et al.* 2011) y *Holcocerus arenicola* Staudinger (Jing *et al.* 2010).

Para el caso de *C. redtenbacheri*, un indicador de que las hembras liberan la feromona sexual es la exposición de sus glándulas abdominales, igual que lo hacen muchos otros lepidópteros (Ando y Yamakawa, 2011). A la fecha, no se han reportado investigaciones de

los componentes de la feromona de *C. redtenbacheri*, conocimiento que sería una herramienta importante para la detección, monitoreo y captura de sus adultos en campo, aportando información útil para establecer programas de manejo de sus poblaciones con objeto de aprovecharlas sin sobreexplotarlas.

Existen varias técnicas para extraer los compuestos feromonales. Las más importantes han sido la extracción con disolvente y, más recientemente, la microextracción en fase sólida (MEFS) en modo directo, MEFS con hembras vivas y MEFS con calentado de glándulas.

La MEFS, técnica que no utiliza solventes Pawliszyn (2012), es rápida, limpia, versátil y se puede acoplar al cromatógrafo de gases. La MEFS utiliza una pequeña cantidad de absorbente dispersado en la superficie de la fibra, en el cual se absorben los compuestos volátiles de interés.

La extracción con disolventes implica el uso de solventes como pentano, hexano o diclorometano porque solubilizan los compuestos de muchas feromonas (Golud 1984). La cantidad del disolvente, el tiempo de exposición y el número de glándulas u oviposidores usados varía de una especie a otra. Liu *et al.* (2002), expusieron glándulas de *Acleris fimbriana* Meyrick durante 30 minutos en hexano, Chu *et al.* (2005) colocaron 117 glándulas de *Eucosma notanthes* Meyrick en 300  $\mu$ L de hexano por dos días, Fang *et al.* (2005) cortaron una glándula de *Holcocerus hippophaecolus* Hua y la expusieron en 10  $\mu$ L de hexano por 20 minutos y Uehara *et al.* (2015) colocaron una glándula de *Dolbina tancrei* Staudinger en 50  $\mu$ L durante 15 minutos. Por lo cual se deben realizar estudios preliminares para determinar el tiempo de exposición y el número de glándulas a utilizar para encontrar los compuestos de la feromona de *C. redtenbacheri*.

En caso de la técnica de MEFS con hembras vivas, éstas se confinan en viales HS (headspace, en inglés) y, cuando exponen la glándula se introduce la fibra en el vial durante algún tiempo: 3 hr (Kenari *et al.* 2011) hasta 16 hr (Chen *et al.* 2006). Con la técnica de frotado o acercamiento, las palomillas se mantienen dentro de jaulas y cuando exponen su glándula, la fibra es frotada contra esta para absorber los compuestos volátiles (Frérot *et al.* 1997). Para la técnica de calentamiento de glándulas, éstas son cortadas a la hembras en el momento en que las exponen, se colocan en viales y se calientan a 170 °C por 10 minutos, entonces se introduce la fibra al vial para coleccionar los compuestos volátiles (Chu *et al.* 2005).

Ya que las feromonas se encuentran en cantidades bajas del orden de ng o pg y son mezclas de compuestos volátiles y semivolátiles, es imprescindible el uso de equipos de alta resolución y sensibilidad como los cromatógrafos de gases (Jones y Holdham 1999).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar los componentes de la feromona sexual de *C. redtenbacheri*.

## 2.2.MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Material biológico

Se obtuvieron larvas de *C. redtenbacheri* comercializadas en las localidades de Pozos y Hueypoxtla, Hidalgo, las cuales fueron llevadas al laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. De la población de larvas adquiridas se eligieron las de sexto y séptimo instares (Figura 1) cuyo peso oscilaba de 0.4 a 1.0 g (Hernández-Livera). Para inducir las larvas a pupación se siguió la metodología descrita por Miranda *et al.* (2013), que consiste en colocar tubos de poliducto de 10 cm de largo y 3.2 cm ( $1^{1/4}$ ) de diámetro, los tubos se colocaron verticalmente dentro de charolas de plástico, (de 36 cm de largo x 29 cm de ancho x 12 cm de alto) en cada una de las charolas se colocó 50 tubos, a los cuales se les agregó una capa de 5 cm de mezcla de vermiculita y tierra, a una proporción de 50:50. Finalmente se depositaron las larvas dentro de lo tubos y se mantuvieron en completa oscuridad hasta la emergencia de los adultos.



**Figura 1.** Larvas de *Comadia redtenbacheri* de sexto y séptimo instares.

Las larvas inducidas a pupación se mantuvieron en oscuridad hasta la emergencia de los adultos (abril-mayo). Recién emergidos, los adultos fueron sexados con base en el aspecto de sus antenas: aserradas en las hembras y bipectinadas en los machos. Las hembras se colocaron en jaulas de tul de 12x12x12 cm (largo, ancho y alto) (Figura 2).



**Figura 2.** Hembras adultas de *Comadia redtenbacheri*.

Antes de realizar la extracción de los componentes de la feromona se determinó el intervalo de tiempo en que hembras de *C. redtenbacheri* realizan el llamado a los machos, para lo cual se observaron las hembras cada 15 minutos para identificar el periodo en que ello ocurre. Se observó que dicho proceso se realiza de las 18:00 a las 24:00 h y, que de las 20:00 a las 22:00 h presentan la mayor actividad de llamado. En esta especie Llanderal *et al.* (2007) determinaron que el tiempo de vida de los adultos oscila de tres a cinco días, por lo cual, en esta investigación en todos los ensayos de extracción de la feromona se utilizaron hembras vírgenes de dos días de nacidas. En el momento en que la palomilla mostraba la posición de llamado con la liberación del ovipositor (Figura 3), se procedía a tomar la muestra para realizar cada uno de los ensayos como se explica a continuación.



**Figura 3.** Hembra de *Comadia redtenbacheri* con el ovipositor extendido en posición de llamado.

### **2.2.2. Extracción de los compuestos feromonales**

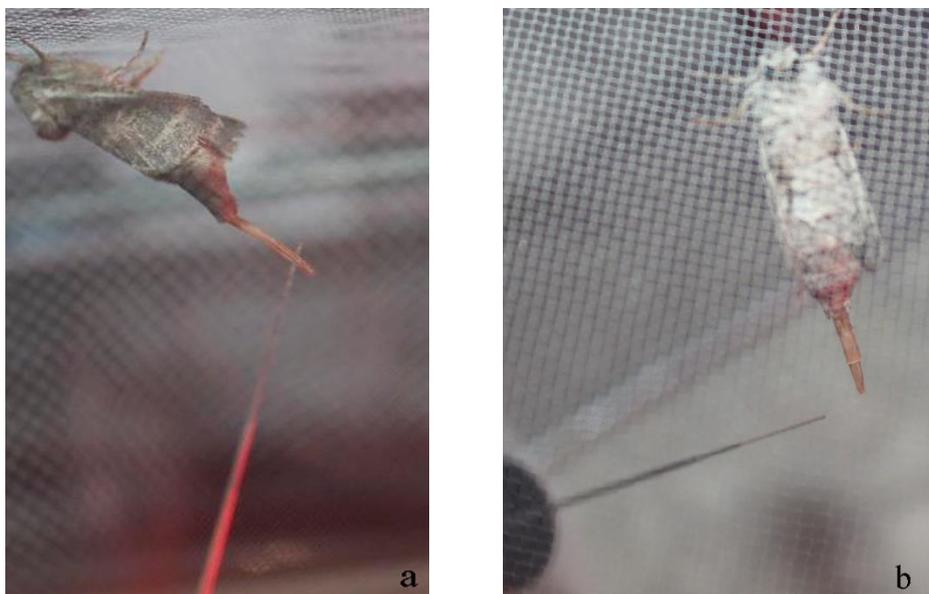
Para la determinación de los compuestos volátiles de la feromona de *C. redtenbacheri* se probaron cuatro técnicas de extracción: 1) microextracción en fase sólida (MEFS) en modo directo, 2) MEFS con hembras vivas, 3) MEFS con calentado de glándulas y 4) extracción con disolvente orgánico, las que se describen a continuación.

#### ***2.2.2.1. Micro extracción en fase sólida***

Las tres técnicas utilizadas en la MEFS fueron: 1) modo directo, 2) hembras vivas y 3) calentado de glándulas. Para dichos análisis se utilizó un Holder manual modelo 57330-U que contenía una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ . Supelco®). En la técnica uno la fibra se expuso directamente al ovipositor y en las técnicas dos y tres se usaron viales de vidrio de 20 mL HS con tapa de rosca y septo de PTFE (politetrafluoroetileno, teflón). En todos los ensayos con MEFS antes de usar la fibra de PDMS, ésta se acondicionó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como blancos se expuso la fibra en viales vacíos.

### MEFS modo directo

El ensayo de MEFS en modo directo se realizó con las hembras adultas de *C. redtenbacheri* dentro de las jaulas. En este modo se realizaron dos tipos de ensayos: frotación de la fibra con el ovipositor (Frérot *et al.* 1997) y aproximación sin contacto. En el primero se frotó la fibra de PDMS sobre el ovipositor de cinco hembras durante dos horas (Figura 4a) y, dado que la muestra cromatográfica mostraba una gran cantidad de compuestos, se consideró que no era conveniente el contacto directo de la fibra con el ovipositor. Por lo que se procedió a realizar un segundo ensayo, modificando la metodología para la aproximación sin frotación. La fibra de PDMS se acercó al ovipositor a medio centímetro aproximadamente (Figura 4b). En este modo se ensayaron diferentes tiempos de exposición y número de glándulas: una glándula (0.5 h, n = 7), cuatro glándulas (2 h, n = 1) y cinco glándulas (2 h, n = 2). En todas las pruebas, una vez realizado la absorción de los compuestos volátiles se procedió a desorber los analitos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.



**Figura 4.** a) Frotado de fibra sobre glándula y b) acercamiento de fibra en glándulas de hembras de *Comadia redtenbacheri*.

### *MEFS con hembras vivas*

Se utilizó la metodología empleada por Chen *et al.* (2006) y Kenari *et al.* (2011) variando el tiempo de exposición empleado por dichos autores. En esta modalidad se realizaron varios ensayos. Las pruebas consistieron en colocar una hembra dentro de un vial HS de 20 mL. En cuanto se observó el momento de llamado de la hembra inmediatamente se insertó la fibra y se expuso está durante 3 h (n = 4) (Figura 5a). Para tener una idea de la cantidad de feromona que liberaba una hembra, se procedió a exponer la fibra al ovipositor durante tres días en el tiempo de llamado de la hembra, haciendo un total de 11 h.

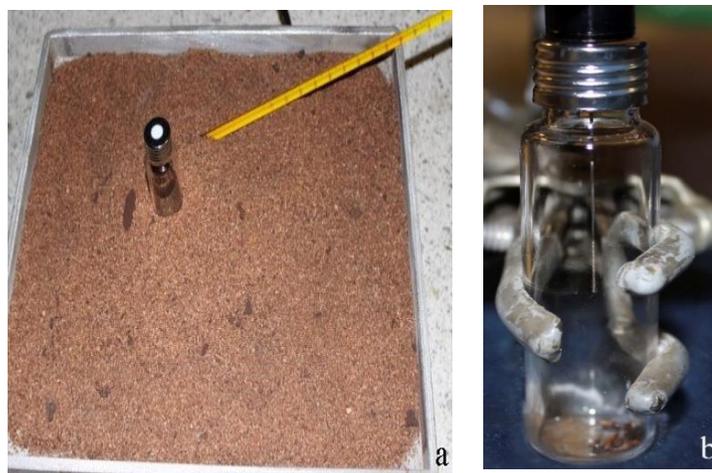
Para capturar mayor cantidad de volátiles de la feromona de *C. redtenbacheri*, se colocaron varias hembras dentro de viales HS (n = 37), con una hembra por vial (Figura 5b). La introducción de la fibra al vial se llevó acabo cuando se observaba que la hembra tenía expuesto el ovipositor y así sucesivamente se logró la absorción de los compuestos feromonales con diferente número de hembras y diferentes tiempos de exposición de la fibra: 5 hembras (1.5 h), 7 hembras (2.5 h) y 25 hembras (5.5 h). Para descartar que los machos también liberaran los mismos compuestos volátiles que las hembras, se realizó el procedimiento descrito anteriormente con 15 machos (3 h). Para el ensayo en el cual se emplearon 25 hembras, dicha cantidad se explica porque las palomillas se estresan al tener poco espacio dentro del vial y liberan el ovipositor poco tiempo, por lo que fue necesario capturar los compuestos volátiles con un mayor número de hembras durante 5.5 h.



**Figura 5.** a) Exposición de fibra, b) Hembras vivas de *Comadia redtenbacheri* dentro de viales.

#### *MEFS con calentado de glándulas*

Para realizar la técnica de MEFS con calentado de glándulas se cortó el ovipositor de la hembra, ya que contiene las glándulas que liberan los compuestos que constituyen la feromona y se colocó en un vial de 20 mL HS. En este ensayo se cortó el ovipositor con tijeras quirúrgicas al momento de llamado y se colocó en un vial de 20 mL HS. Posteriormente en un baño de arena previamente calentado a 170 °C se colocó el vial durante 10 minutos (Figura 6a). Después de retirarlo inmediatamente se insertó la fibra dentro del vial, exponiéndola durante cinco minutos (Figura 6b). Este procedimiento se llevó a cabo con 5, 12 y 25 glándulas, modificando la metodología descrita por Chu *et al.* (2005), quienes trabajaron con 5 glándulas y viales de 2 mL.



**Figura 6.** a) Calentado de vial con glándulas de *Comadia redtenbacheri*, b) exposición de fibra después del calentado.

Es importante utilizar varias técnicas para capturar volátiles y para corroborar la ausencia o presencia de los mismos compuestos. Los estudios realizados por Pineda *et al.* (2015) mostraron que no todas las técnicas capturan los mismos compuestos y además lo hacen en diferente proporción.

#### **2.2.2.2. Extracción con disolvente orgánico**

Para realizar este ensayo se usó hexano grado HPLC ( $\geq 97\%$ , CHROMASOLV®), jeringas Hamilton de 100, 250 y 500  $\mu\text{L}$ , viales de 2 mL e insertos de 200  $\mu\text{L}$ .

Debido a la disponibilidad del material biológico, los ensayos descritos a continuación corresponden a tres etapas, realizadas de abril a mayo de 2014 al 2016. En 2014 se realizaron ensayos preliminares que consistieron en cortar con tijeras quirúrgicas las glándulas de hembras de dos días de emergidas, en el momento apropiado (Figura 7). Ya cortadas las glándulas se colocaron en un vial de 2 mL que contenía 200  $\mu\text{L}$  de hexano. El proceso de extracción se realizó durante 12 horas. Con la finalidad de observar un mayor número de compuestos se fue incrementando el número de glándulas. Se realizó la extracción con una glándula, cuatro glándulas ( $n = 2$ ) y cinco glándulas ( $n = 4$ ) en 200  $\mu\text{L}$  de hexano. Para incrementar la superficie de contacto de las glándulas con el disolvente, en 400  $\mu\text{L}$  de hexano se colocaron 10 glándulas ( $n = 3$ ). Sin embargo, se observó que era imprescindible utilizar

contenedores de menor volumen, por lo cual, en los ensayos realizados en 2015 se utilizaron insertos de 200  $\mu\text{L}$ . En todos los experimentos realizados en esta modalidad los extractos fueron guardados en congelador a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para ello se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras en el cromatógrafo de gases.



**Figura 7.** Corte de glándulas de hembras de *Comadia redtenbacheri*.

En los ensayos realizados en 2015 se modificó el tiempo de exposición de las glándulas en el disolvente, además del tamaño del contenedor (inserto de 200  $\mu\text{L}$ ), con el mismo procedimiento de las pruebas realizadas en 2014. Para asegurar que las glándulas estuvieran sumergidas totalmente en el solvente se colocó dentro del vial de 2 mL el inserto con 200  $\mu\text{L}$  de hexano al que se adicionaron los ovipositores (Figura 8). Se realizaron pruebas con cinco glándulas (0.5 h), seis glándulas (1 h), ocho glándulas (0.25 h) y 12 glándulas (2 h).



**Figura 8.** Glándulas con hexano en vial con inserto.

Con base en los resultados obtenidos en 2015, se consideró que un tiempo de extracción de 15 minutos era suficiente para detectar los dos compuestos constituyentes de la feromona de *C. redtenbacheri*. En 2016 los ensayos consistieron en disminuir la cantidad de disolvente y el tiempo de exposición de las glándulas, con la finalidad de reducir los compuestos no polares coextraídos para tener extractos más limpios. Por lo que, en un vial de 2 mL con un inserto de 200  $\mu$ L, se colocó un ovipositor en 50  $\mu$ L de hexano durante 10 minutos ( $n = 11$ ).

### **2.2.3. Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-DSM)**

La detección de los componentes de la feromona sexual de *C. redtenbacheri* se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies Inc., 7890A Series® (California, USA) acoplado a un detector selectivo de masas 5975C en modo de impacto electrónico (70eV). Para la separación de los compuestos se empleó una columna HP-5ms (30 m x 0.250 mm y 0.25  $\mu$ m). Como gas acarreador se usó Helio con una pureza del 99.999% a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La rampa de temperatura empleada fue la siguiente: 50 °C durante 2 min, 5 °C/min hasta 250 °C por 1 min y 2 °C/min hasta 280 °C por 5 min. La temperatura del inyector (modo splitless) y del detector fue de 250 °C. La válvula de purga se abrió a los 0.35 min cuando se inyectó 1  $\mu$ L de la muestra y a los 2 min en los análisis de MEFS, en este caso el tiempo de desorción de la fibra de polidimetilsiloxano fue de 8 min para desorber los analitos y acondicionar la fibra para la siguiente muestra. Los compuestos se monitorearon en modo SCAN ( $m/z$  40-350).

La identificación preliminar de los compuestos se realizó mediante búsqueda y comparación de los espectros de masas en la biblioteca NIST V. 2002. La confirmación de los compuestos se realizó con la comparación de los tiempos de retención y los espectros de masas con los de los estándares correspondientes.

#### **2.2.4. Preparación de los estándares**

Se utilizaron estándares Z5-14:Ac y Z9-14:Ac (98%) de Bedoukian Research Inc. (Estados Unidos). La preparación de estos se realizó peso/peso en una balanza analítica Mettler Toledo (NewClassicMS, 0.01 mg).

Para el análisis cuantitativo en la extracción con disolvente orgánico se utilizaron curvas de calibración externa. Se preparó una concentración inicial de 64985  $\mu\text{g g}^{-1}$  del estándar Z5-14:Ac, a partir de la que se realizó una dilución 2226  $\mu\text{g g}^{-1}$  y de ésta una de 44.87  $\mu\text{g g}^{-1}$ , con las cuales se prepararon las siguientes concentraciones: 3.6, 4.6, 8.7, 9.6, 15.1, 22.61, 27.48  $\mu\text{g g}^{-1}$  para la curva de calibración. Todos los estándares fueron disueltos en hexano. Para el estándar Z9-14:Ac se preparó una concentración inicial de 16152  $\mu\text{g g}^{-1}$  y a partir de ésta se realizaron diluciones intermedias de 541.77  $\mu\text{g g}^{-1}$  y 22.32  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Ambas se utilizaron para preparar siguientes concentraciones: 1.03, 3.1, 6.4, 8.6, 10.48 16.5 y 27  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Mediante curvas de calibración elaboradas a partir de los estándares de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac se cuantificó la concentración de cada compuesto en los extractos obtenidos con disolvente orgánico (una glándula en 50  $\mu\text{L}$  de hexano por 10 minutos).

#### **2.2.5. Comparación de diferentes técnicas**

La analogía de las cuatro técnicas de extracción se realizó con datos de una glándula, comparando la abundancia de las áreas de cada técnica y la limpieza de cada uno de los cromatogramas.

#### **2.2.6. Análisis estadístico**

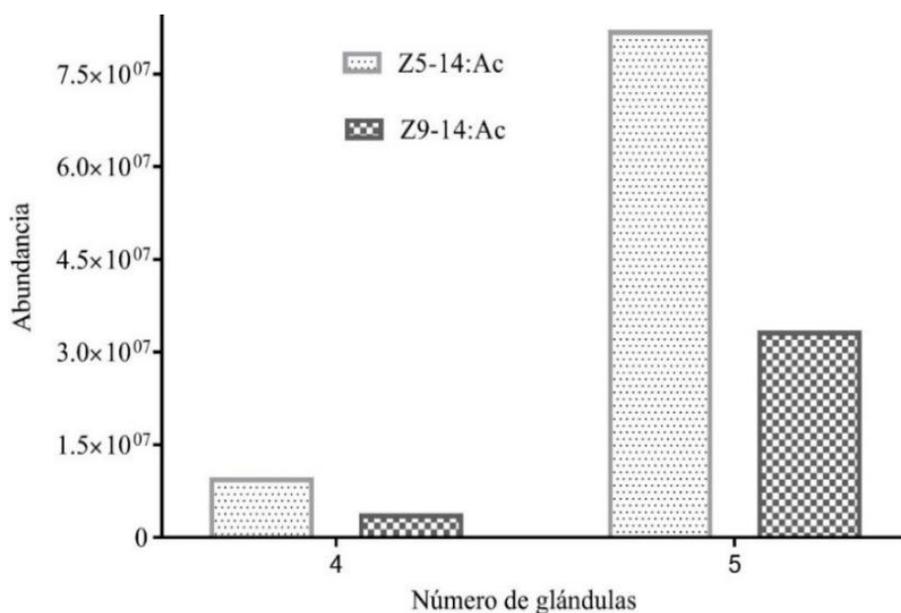
Se realizó análisis de varianza de un factor entre la técnica de extracción con disolvente y la de MEFS en modo directo.

## 2.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Microextracción en fase sólida

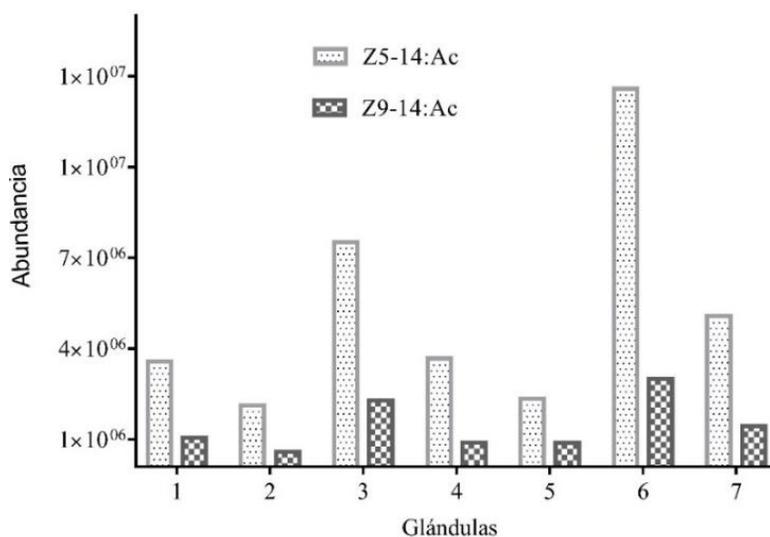
#### *MEFS modo directo*

El cromatograma del preliminar (2015), obtenido de la fibra que se frotó por dos horas sobre el ovipositor, mostró dos picos mayoritarios, a los que, con base en la biblioteca NIST, se les identificó provisionalmente como Z5-Tetradecen-ol-acetato (Z5-14:Ac) y Z9-Tetradecenol-ol-acetato (Z9-14:Ac), cuyas áreas fueron 81701967 y 33041585, respectivamente. Se estimó que tales valores eran inconvenientemente altos, que por un lado podrían saturar la columna cromatográfica y por otro dañarla, disminuyendo su vida útil. Por lo que en los ensayos subsecuentes se consideró que para *C. redtenbacheri* era innecesario frotar la fibra, por lo que se continuó con ensayos en los que solo se acercó la fibra al ovipositor (a 0.5 cm), con lo que la señal cromatográfica disminuyó 11 veces en pruebas con cuatro y cinco glándulas (Figura 9).



**Figura 9.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en *Comadia redtenbacheri*, con dos horas de exposición a la fibra de PDMS, a 0.5 cm de las glándulas.

En 2016, dada la mayor disponibilidad de material biológico se cortaron siete glándulas y se colocó cada una de ellas en 50  $\mu$ L de hexano por 15 minutos. Los resultados muestran la gran variabilidad en la abundancia de los compuestos por cada glándula (Figura 10). Dicha variabilidad fue calculada considerando todos los resultados de las áreas y el coeficiente de variación por cada compuesto fue de Z5-14:Ac fue de 70% y, para Z9-14:Ac, 60%.



**Figura 10.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en *C. redtenbacheri* con 30 min de exposición a la fibra de PDMS a 0.5 cm de cada glándula (n = 7).

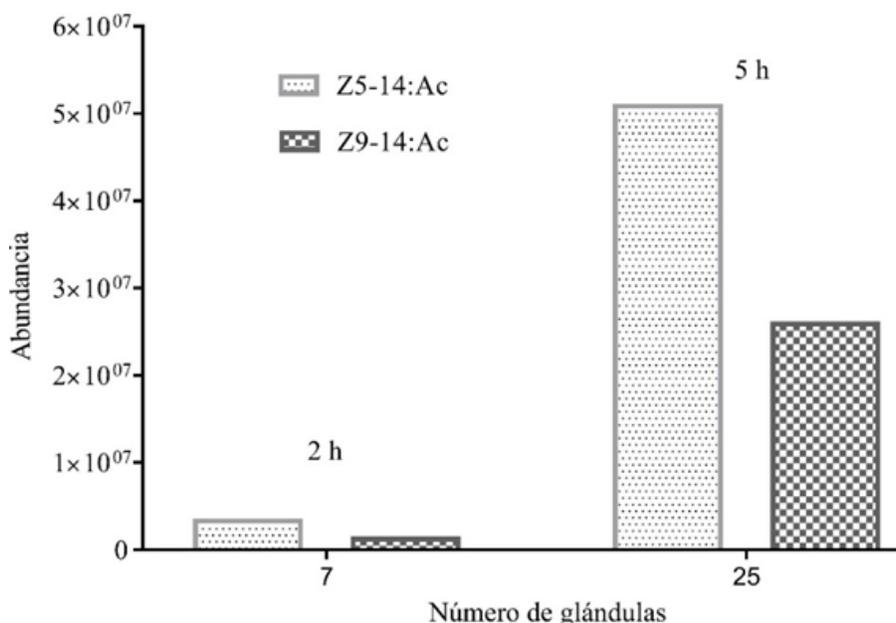
De los ensayos anteriores (Figura 9 y 10) se deduce que el frotar o solo acercar la fibra de MEFS sobre las glándulas de *C. redtenbacheri*, permite encontrar los mismos compuestos y que la cantidad obtenida de cada compuesto depende del número de glándulas y del tiempo de exposición de la fibra. Con la MEFS en modo directo se concluye que una glándula de *C. redtenbacheri* libera suficiente cantidad de volátiles en 30 minutos y que permite identificar los dos componentes de la feromona sexual. A diferencia de los ensayos realizados en este estudio, Ando *et al.* (2004) acercaron la fibra de dos a tres horas a hembras de: *Phyllonorycter sylvella* Haworth, *Phyllonorycter blancardella* Fabricius y *Phyllonorycter heegerella* Z. para obtener los volátiles. De lo anterior, es evidente que el tiempo de exposición de la fibra y el número de glándulas a utilizar va a depender de la especie, por lo cual se deben realizar

estudios preliminares para determinar el tiempo de exposición y el número de glándulas a utilizar, tal como se hizo en este trabajo.

La técnica de MEFS de modo directo tiene la ventaja de extraer los compuestos volátiles que integran la feromona de forma similar a las condiciones naturales, ya que los insectos no se destruyen y se pueden realizar varias repeticiones. Sin embargo, la desventaja es que además de capturar los analitos también son absorbidos otros compuestos volátiles presentes en el ambiente, los cuales, pueden tener constantes de distribución cercanas y los picos no se podrían separar, por lo que sería necesario modificar los métodos cromatográficos o utilizar una columna analítica distinta.

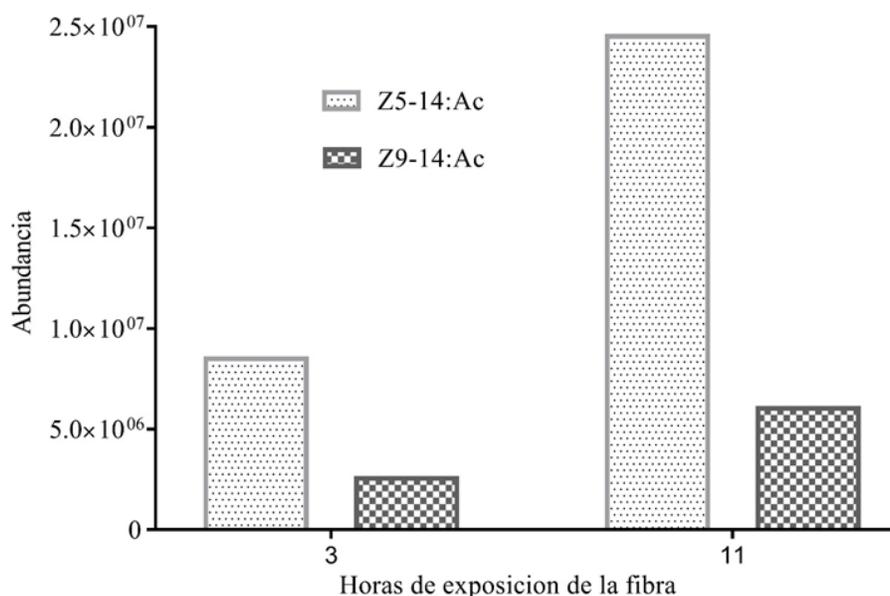
#### *MEFS con hembras vivas*

Con la técnica de MEFS con hembras vivas colocadas dentro de viales HS de 20 mL se identificaron los mismos compuestos encontrados con el modo directo. Similar a los ensayos anteriores, se observa que a medida que se aumenta el número de glándulas y el tiempo de exposición se incrementa el área de los compuestos (Figura 11).



**Figura 11.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en *C. redtenbacheri* en 2015, en función del tiempo de exposición y número de hembras vivas (vial 20 HS mL).

En la técnica de MEFS con hembras vivas, los resultados mostraron que una glándula y tres horas de exposición de la fibra, fueron suficientes para detectar ambos analitos (Figura 12), a diferencia a lo encontrado en el cosido *Cossus insulares* (Chen *et al.* 2006), quienes expusieron la fibra con una hembra por 16 horas. El tiempo de exposición de la fibra va a depender de la cantidad de volátiles que una hembra libere, tal como se ha determinado en la familia Noctuidae quien libera su feromona sexual en cantidades de 10 hasta 100 ng y que una hembra es suficiente para identificar sus componentes; mientras que los microlepidópteros de las superfamilias Gracillarioidea e Yponomeutoidea producen tan poca que se necesitan gran cantidad de hembras para poder realizar los análisis (Ando *et al.* 2004) y detectar picos cromatográficos por arriba de la cantidad mínima detectable y cuantificable del compuesto.



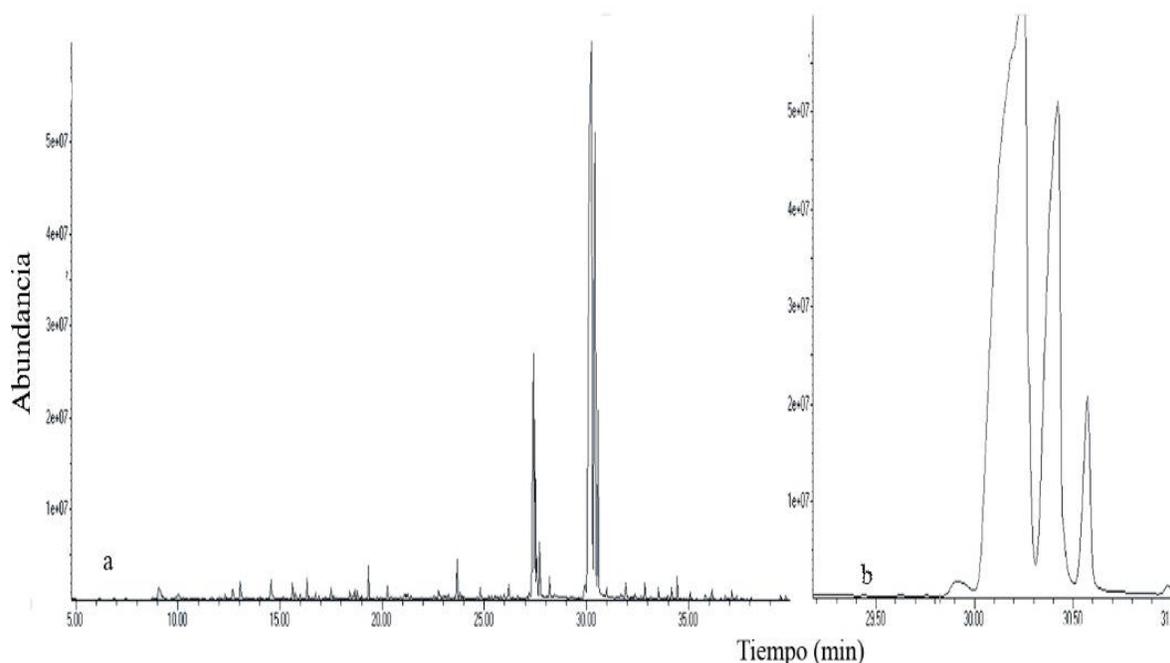
**Figura 12.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en *C. redtenbacheri*, en 2016 en una hembra viva (vial 20 HS mL) en función del tiempo de exposición de la fibra.

La MEFS con hembras vivas tiene las siguientes ventajas: los cromatogramas son más limpios porque la fibra no captura contaminantes del medio ambiente y las muestras no se destruyen, lo que permite realizar varias pruebas con un solo insecto. Los inconvenientes

radican en el tamaño del vial y del insecto. Para *C. redtenbacheri* un vial HS de 20 mL fue suficiente, pero sería deseable contar con viales de mayor volumen para disminuir el estrés del insecto, lo que implica su maquila, ya que no están disponibles comercialmente.

#### *MEFS con calentado de glándulas*

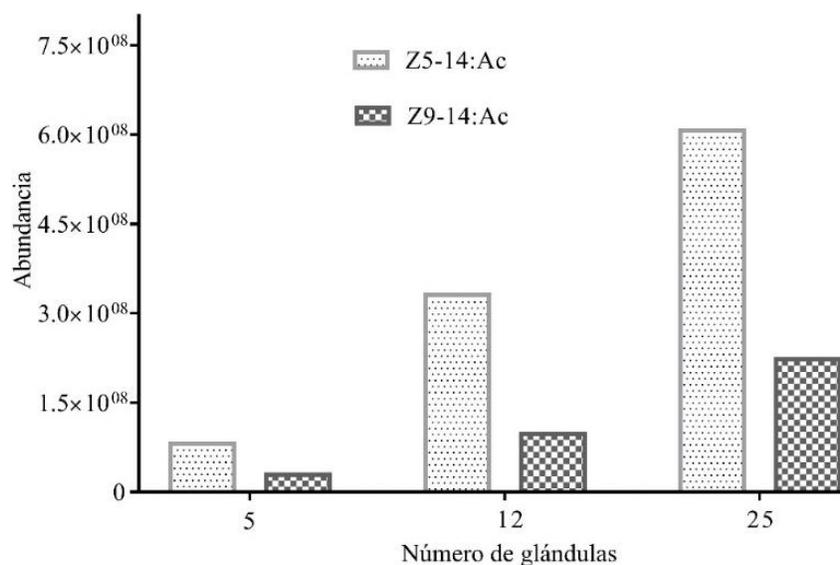
Los cromatogramas obtenidos en los ensayos realizados con la técnica de MEFS con calentado de glándulas (170 °C por 10 min), mostraron tres picos predominantes (Figura 13a y 13b). El Z5-14:Ac y el Z9-14:Ac y un tercer pico cromatográfico que podría ser 1-Tetradecenil acetato, 1-Hexadecanol acetato o 1-Pentadecanol acetato, compuesto que no fue identificado mediante comparación con un estándar.



**Figura 13.** a) Cromatograma de MEFS con calentado de 25 glándulas a 170 °C por 10 min y exposición de fibra durante 5 min, b) acercamiento de los compuestos de interés.

Los ensayos mostraron que cinco glándulas eran suficientes para detectar picos simétricos de los compuestos que integran la feromona, pero que el calentar 12 y 25 glándulas incrementaba la abundancia de los picos (Figura 14), provocando la sobre saturación de los compuestos en la columna, sobre todo del compuesto mayoritario (Z5-14:Ac), con lo cual

los picos se deforman y no son simétricos (Figura 13b), situación no deseable en análisis cromatográfico.



**Figura 14.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac identificados en *C. redtenbacheri*, en función del número de glándulas calentadas a 170 °C por 10 min y exposición de la fibra durante 5 min.

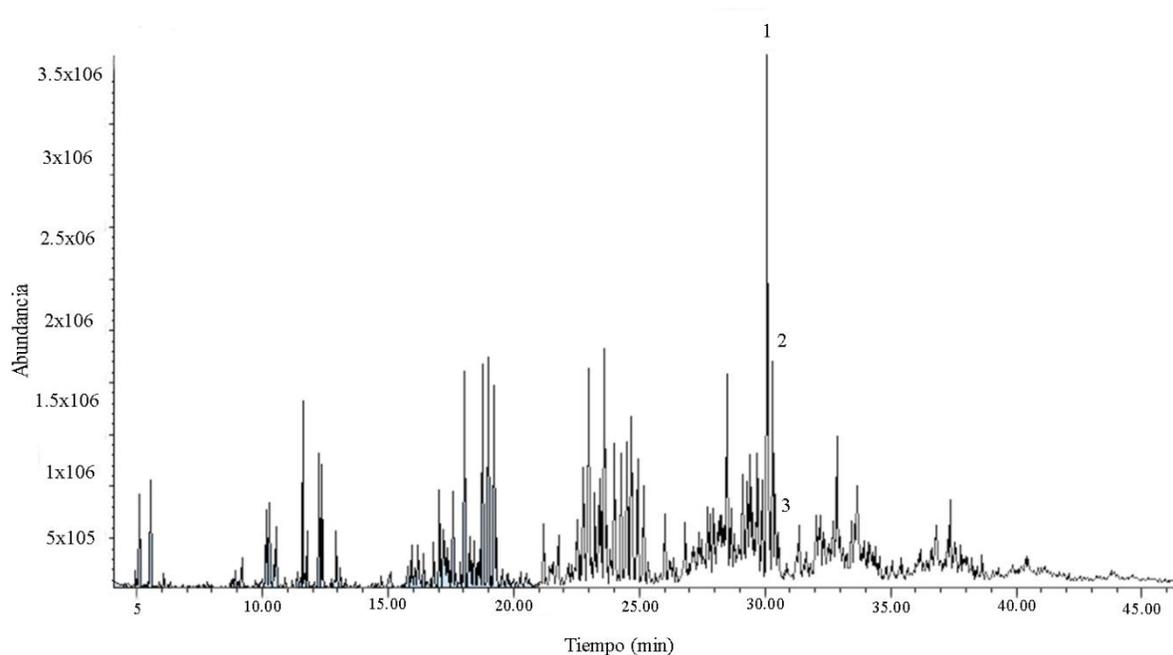
Los resultados obtenidos con la técnica de calentado de glándulas de *C. redtenbacheri* coinciden con lo encontrado por Chu *et al.* (2005) quienes determinaron que con el calentado de cinco glándulas ahorraron tiempo en la identificación de los compuestos de la feromona de *Eucosma notanthes* Meyrick y dicha cantidad fue suficiente en comparación con la extracción con disolvente orgánico en la cual utilizaron 117 glándulas.

Uno de los inconvenientes de la MEFS con calentado de glándulas es el riesgo de no detectar compuestos debido al sobrecalentado, tal como mencionan Jones y Oldham (1999), quienes indican que por arriba de 140 °C los compuestos feromonales se descomponen al emplear fibras de carbowax-divinilbenceno. Por lo cual se deben de utilizar varias técnicas para detectar todos los compuestos presentes en una muestra, tal como los estudios realizados por Pineda *et al.* (2015) quienes demostraron que no todas las técnicas capturan los mismos compuestos y lo hacen en diferente proporción. En este estudio no se observó dicho problema y fueron suficientes 5 glándulas para detectar los dos analitos.

Las ventajas de la técnica de MEFS con calentado de glándulas son el extraer todos los compuestos volátiles que integran la feromona y que se requiere poco tiempo de exposición de la fibra. Su desventaja es que extrae otro tipo de compuestos presentes en el ovipositor, obteniéndose cromatogramas con una gran cantidad de analitos que no son constituyentes de la feromona.

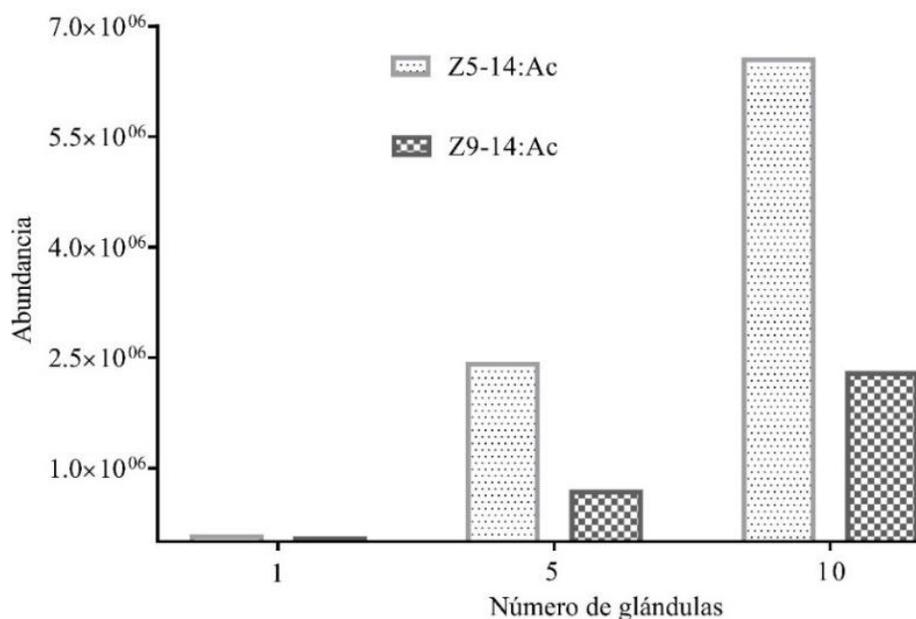
### 2.3.2. Extracción con disolvente orgánico

La extracción con disolvente orgánico ha sido el método tradicional utilizado para conocer los compuestos constituyentes de las feromonas. Dado que no había información de la feromona de *C. redtenbacheri*, se realizaron ensayos con base en la revisión de literatura para otras especies. En 2014 se utilizaron una, cinco y 10 glándulas exponiéndolas 12 horas en 200  $\mu$ L de hexano. Los cromatogramas mostraron la presencia de dos compuestos mayoritarios (Z5-14:Ac y Z9-14:Ac) y de otros analitos contaminantes no vinculados a la feromona. Es claro que esta técnica no es selectiva a compuestos volátiles y extrae otros analitos como los ácidos grasos presentes en el material biológico (Figura 15).



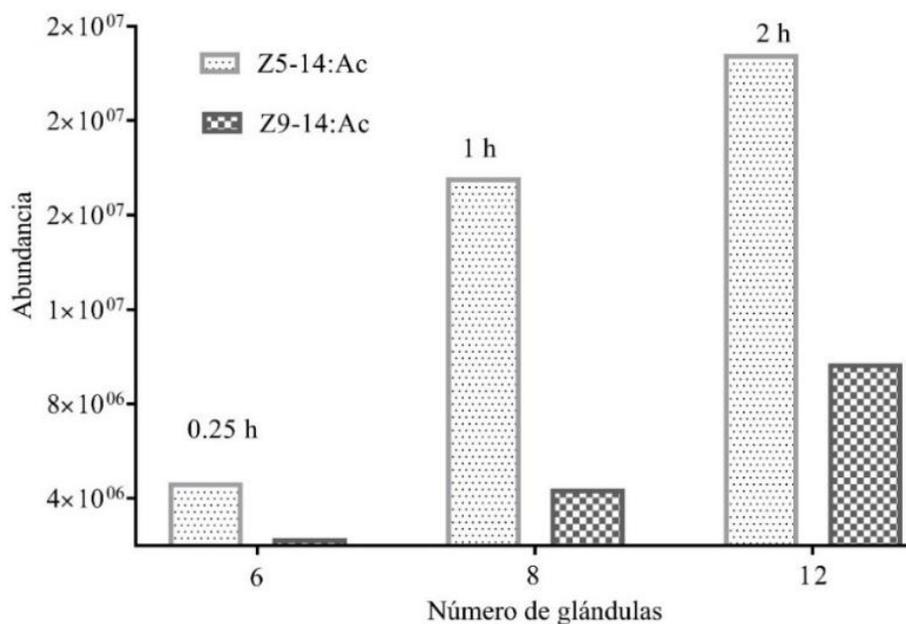
**Figura 15.** Cromatograma de 10 glándulas expuestas 12 horas en 200  $\mu$ L de hexano. Pico 1 = Z5-14:Ac y pico 2 = Z9-14:Ac.

Se observó que a medida que se incrementó el número de glándulas (1, 5, y 10), se extrajo mayor cantidad de los compuestos feromonales (Figura 16).



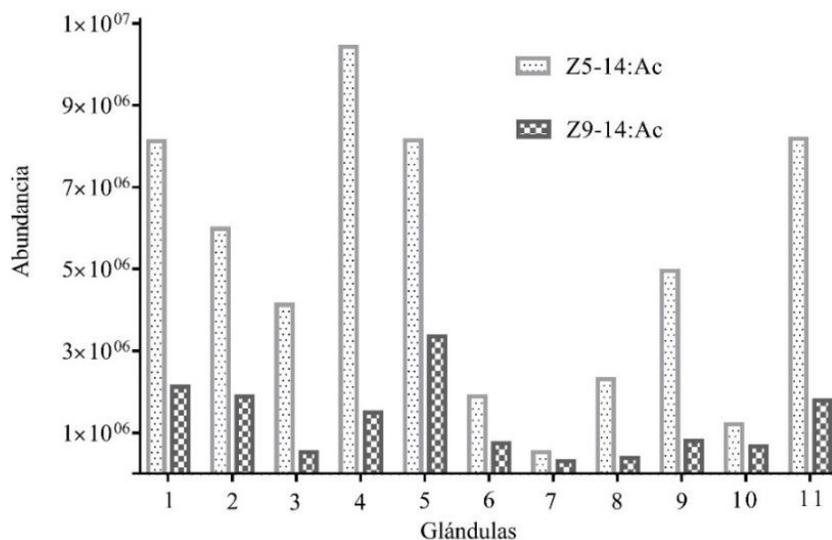
**Figura 16.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en función del número de glándulas expuestas en disolvente 12 h.

Se logró determinar que con 15 minutos de exposición de fibra y seis glándulas produjeron niveles adecuados de la señal cromatográfica (Figura 17). Por lo tanto, habría que reducir el número de glándulas, el volumen y el tiempo de extracción en el hexano.



**Figura 17.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac en función del número de glándulas y tiempo de exposición en hexano.

El ensayo con una glándula y exposición por 10 minutos en 50  $\mu$ L de disolvente demostró la gran variabilidad de los dos compuestos (Figura 18), ya que los coeficientes de variación para el Z5-14:Ac y Z9-14:Ac fueron de 66% y 74%, respectivamente, similares a los obtenidos en las pruebas con MEFS en modo directo. Este ensayo demostró que con una glándula, la reducción del disolvente y 10 minutos de extracción eran suficientes para cuantificar los dos compuestos presentes en la feromona de *C. redtenbacheri*, además de que se disminuía considerablemente la coelución de otros compuestos extraídos por el hexano, dando como resultado cromatogramas sin tantos interferentes.



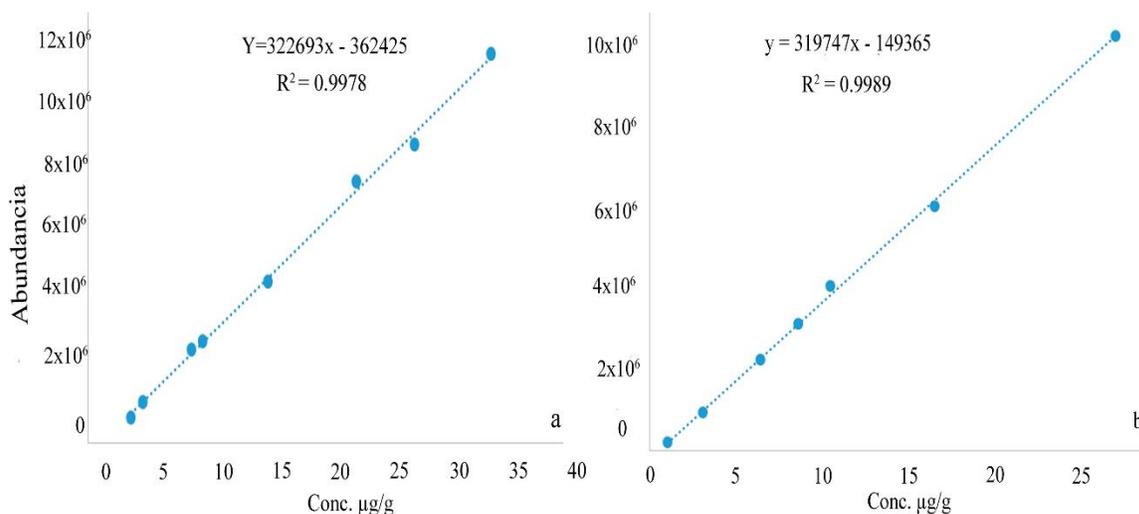
**Figura 18.** Abundancia de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac por glándula con 10 minutos de exposición en el disolvente hexano (n = 11).

Los resultados anteriores ponen de manifiesto, por una parte, que una sola glándula de *C. redtenbacheri* produce cantidades altas de compuestos volátiles, mientras que *Eucosma notanthes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae) produce muy poca, por lo que se necesitaron 177 glándulas (Chu *et al.* 2005) para identificar la feromona. Por otra parte, bastaron 10 minutos de extracción en hexano para hacer posible la identificación de los dos componentes de la feromona de *C. redtenbacheri*. Estos resultados concuerdan con los trabajos encontrados por Bouwer *et al.* (2015), Jintong *et al.* (2001); Jing *et al.* (2010); Zhang *et al.* (2009) y Zhang *et al.* (2011), quienes expusieron glándulas de otros cósidos en disolvente durante 1 a 60 minutos.

El compuesto Z5-14:Ac encontrado en hembras de *C. redtenbacheri*, ya se ha identificado como un componente feromonal de diferentes especies de la familia Cossidae (Pasqualini *et al.* 1982; Capizzi *et al.* 1983; Zhang *et al.* 2001, 2009; Fang *et al.* 2003; Jing *et al.* 2010; Reyes-García *et al.* 2011) y para el caso del compuesto Z9-14:Ac, además de la familia Cossidae también está reportado en la familia Noctuidae; (Avand-Faghih y Frérot, 2008; Rojas *et al.* 2006, Espinoza *et al.* 2012).

### 2.3.3. Cuantificación de los componentes de la feromona de *C. redtenbacheri*.

La concentración de cada compuesto en los extractos obtenidos con disolvente orgánico (una glándula en 50  $\mu\text{L}$  de hexano por 10 minutos), se determinó mediante curvas de calibración externa (Figura 19). La concentración para el Z5-14:Ac fue de 16.9  $\mu\text{g/g}$  y para el Z9-14:Ac fue de 4.5  $\mu\text{g/g}$  ( $n = 11$ ) dando una proporción de 3.8:1. Con un coeficiente de variación de 62% para el Z5-14:Ac y de 66% para el Z9-14:Ac respectivamente.

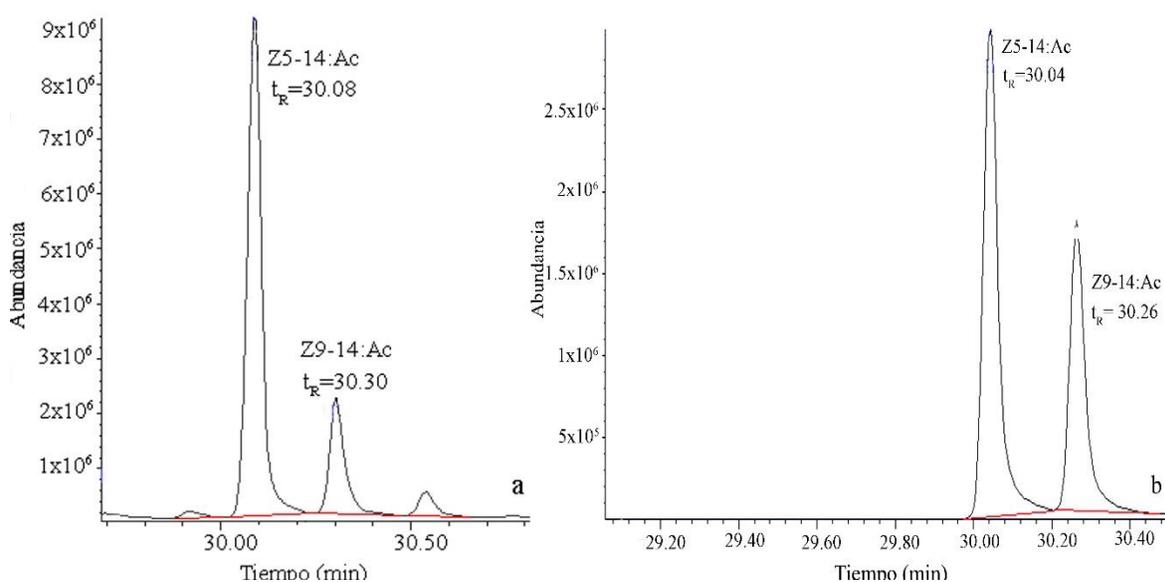


**Figura 19.** Curvas de calibración de a) Z5-14:Ac ( $r = 0.9989$ ) y b) Z9-14:Ac ( $r = 0.9994$ ).

### 2.3.4. Análisis de los extractos de la feromona sexual por CG-DSM

Tanto los extractos obtenidos con el disolvente orgánico como en las muestras de los ensayos con las técnicas de MEFS mostraron la presencia de dos picos cromatográficos mayoritarios cuantificables, con excepción del ensayo con MEFS con calentado de glándulas, que evidencio la presencia de un tercer compuesto detectable. En los demás ensayos, el tercer pico cromatográfico tenía áreas pequeñas, esto afecta la calidad del espectro de masas y dificulta la comparación con los espectros de la biblioteca NIST, por lo que el compuesto puede estar presente en cantidades por abajo del límite de detección y ello justifica que los ensayos se realicen incrementando el número de glándulas o de palomillas.

Los dos compuestos encontrados en la feromona de *C. redtenbacheri* tuvieron tiempos de retención ( $t_R$ ) de 30.068 min y 30.288 min con coeficientes de variación de 0.04% y de 0.06%, respectivamente ( $n = 11$ ). La comparación de los espectros de masas de los picos encontrados en los extractos con los registros presentes en la biblioteca NIST, permitió su identificación provisional como al Z5-14:Ac, al primero, y como Z9-14:Ac, el segundo, analitos que se confirmaron por comparación con los respectivos estándares, ya que tanto los tiempos de retención (Figura 20) como los espectros de masas fueron semejantes para las muestras y estándares.

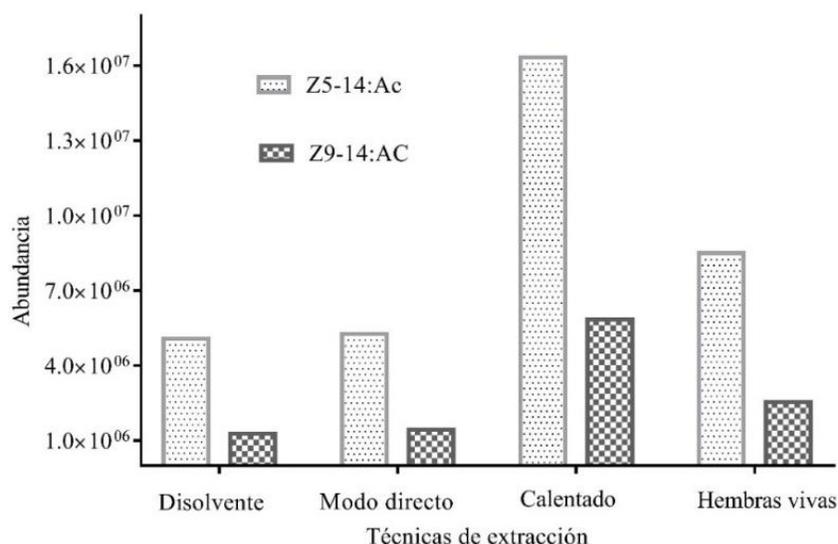


**Figura 20.** Cromatograma de a) una muestra y b) estándares Z5-14:Ac y Z9-14:Ac 27  $\mu\text{g/g}$  y 16  $\mu\text{g/g}$ .

### 2.3.5. Comparación de las diferentes técnicas de extracción

Para contrastar los resultados de las cuatro técnicas de extracción empleadas en este estudio se utilizaron los datos de una glándula y se compararon las áreas de los dos picos cromatográficos encontrados. La técnica de MEFS con calentado de glándulas produjo picos mayores, seguida de la MEFS con hembras vivas, MEFS en modo directo y extracción con disolvente orgánico (Figura 21). Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por

Kenari *et al.* (2011) quienes probaron dos métodos, siendo el mejor la MEFS en modo directo.



**Figura 21.** Áreas de Z5-14:Ac y Z9-14:Ac encontrados con diferentes técnicas con una glándula de *C. redtenchacheri*.

En el análisis de varianza de un factor entre las técnicas de extracción con hexano y la MEFS en modo directo se encontró que no hay diferencias significativas entre ambas técnicas, tanto para el Z5-14:Ac y el Z9-14:Ac (Cuadro 1 y 2).

**Cuadro 1.** Análisis de la Varianza de las áreas del compuesto Z5-14:Ac, obtenidas con las técnicas de extracción con hexano y de MEFS modo directo, ensayos con una glándula (n = 7).

F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Modelo	1	385371102538	385371102538	0.03	0.8681
Técnicas	1	385371102538	385371102538	0.03	0.8681
Error	12	160582335962445	13381861330203		
Total	13	160967707064984			

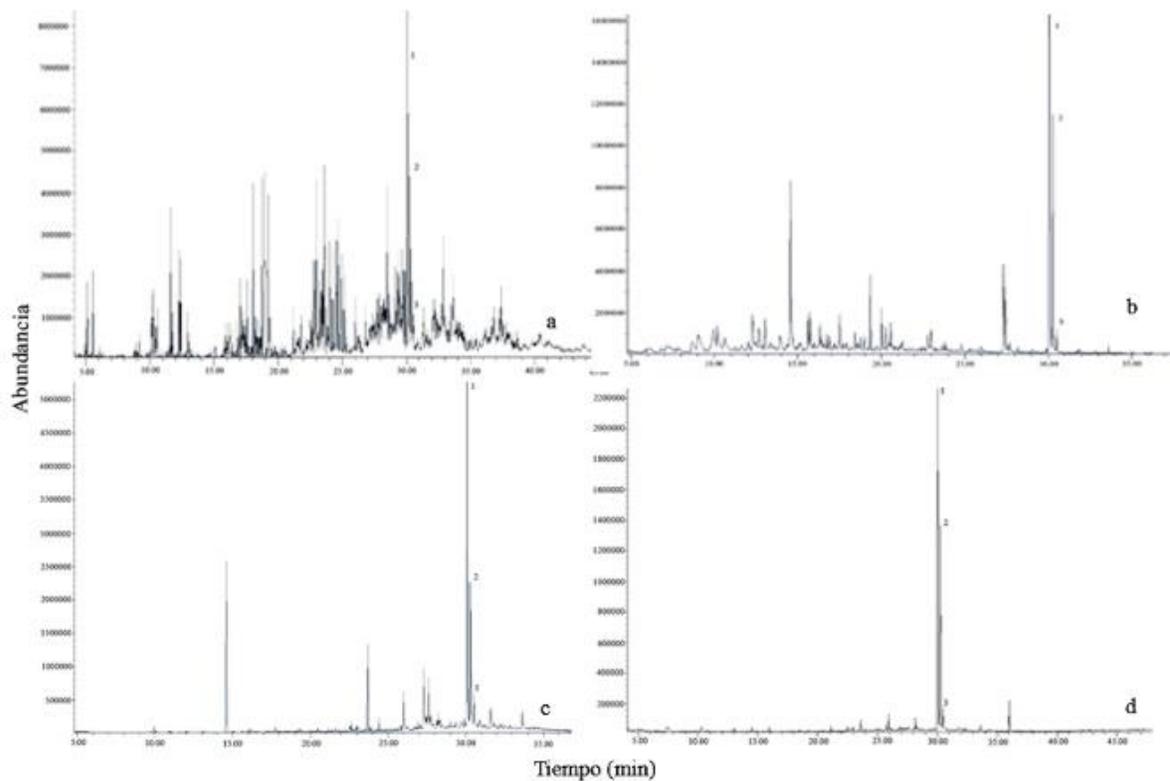
Trat: técnica con hexano y MEFS modo directo;  $\alpha=0.05$ ; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 2.** Análisis de la Varianza de las áreas del compuesto Z9-14:Ac, obtenidas con las técnicas de extracción con hexano y de MEFS modo directo, ensayos con una glándula (n = 7).

F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Modelo	1	5764551361	5764551361	0.01	0.9395
Técnicas	1	5764551361	5764551361	0.01	0.9535
Error	12	11534933346159	961244445513		
Total	13	11540697897520			

Trat: técnica con hexano y MEFS modo directo;  $\alpha= 0.05$ ; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

Con las tres técnicas de MEFS se redujo la cantidad de picos cromatográficos con respecto a la técnica con disolvente orgánico (Figura 22, b, c, d). La MEFS es rápida y utiliza menor número de glándulas para identificar los compuestos de una feromona, coincidiendo con Chu *et al.* (2005). Por lo tanto, la mejor técnica de extracción de los compuestos que integran la feromona sexual de *C. redtenbacheri* con base en la limpieza de los cromatogramas fue: MEFS con hembras vivas, seguida de MEFS modo directo, MEFS con calentado de glándulas y por último la extracción con hexano. La técnica de extracción con disolvente orgánico fue la menos favorable para la identificación de los volátiles feromonales debido a alta contaminación en las muestras (Figura 14a), coincidiendo con Ma y Roelofs, (2002) y Bouwer *et al.* (2015) quienes encontraron que cuando exponían las glándulas en hexano o diclorometano durante muchas horas, las muestras se contaminaron más con ácidos grasos.



**Figura 22.** Cromatogramas de muestras obtenidas con distintas técnicas de captura de volátiles: a) glándula en hexano, b) MEFS calentado de glándulas, c) MEFS modo directo y d) MEFS con hembras vivas.

Con base en los resultados anteriores, es evidente que el uso de diferentes técnicas para el aislamiento e identificación de feromonas sexuales de insectos es lo más adecuado, ya que al trabajar con una sola técnica no se puede asegurar la identificación de la totalidad de sus componentes.

## 2.4. CONCLUSIONES

Mediante las técnicas de extracción con disolvente orgánico y MEFS analizadas por CG-DSM, se logró la identificación de dos compuestos presentes en la feromona sexual de *C. redtenbacheri*: Z-5-tetradecen-1-ol acetato (Z5-14:Ac) y Z-9-Tetradecen-ol-acetato (Z9-14:Ac), con una proporción de 3.8:1.

La mejor técnica para la identificación de los compuestos que integran la feromona sexual de *C. redtenbacheri*, con base en la limpieza de los cromatogramas fue la MEFS con hembras vivas, seguida de la MEFS en modo directo, MEFS con calentado de glándulas y la menos favorable fue la de extracción con hexano, esta debido a que extrae una gran cantidad de compuestos que contaminan las muestras. La técnica de MEFS con calentado de glándulas permite corroborar la presencia de otros compuestos.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Almanoufi, A., Chanan, K., Jamal, M., De Lillo, E., Tarasco, E., and D'Onghia, A. M. 2012. Preliminary experiences in pheromone trap monitoring of *Zeuzera pyrina* (L.) in Syrian apple orchards. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2: 610-618.
- Ancona, L. 1931. Los chilocules o gusanitos de la sal de Oaxaca. *Annales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 2: 265-277.
- Ando, T., Inomata, S-I, and Yamamoto, M. 2004. Lepidopteran sex pheromones. *Topics in Current Chemistry*, 239: 51-96.
- Ando, T., and Yamakawa, Y. 2011. Analyses of lepidopteran sex pheromones by mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30: 990-1002.
- Avand-Faghih, A., Frérot, B. 2008 Identification of the sex pheromone of *Sesamia cretica* Lederer. *Journal of Chemical Ecology*, 34:103-106.
- Bouwer, M. C., Slippers, B., Degefu, D., Wingfield, M. J., Lawson, S., Rohwer, E. R. 2015 Identification of the sex pheromone of the Tree infesting Cossid moth *Coryphodema tristis* (Lepidoptera: Cossidae). *PLOS ONE* 10: 1-15.
- Brown, R. M. 1975. A revisión of the North American *Comadia* (Cossidae). *The Journal of Research on the Lepidoptera*, 14:189-212.
- Capizzi, A., Tonini, C., Guglielmetti, G., Massardo P., and Piccardi, P. 1983. Sex pheromone components of the European goat moth, *Cossus cossus*. *Journal of Chemical Ecology*, 9: 191-200.
- Chen, X., Nakamuta, K., Nakanishi, T., Nakashima, T., Tokoro, M., Mochizuki, F., and Fukumoto, T. 2006. Female sex pheromone of a carpenter moth, *Cossus insularis* (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Chemical Ecology*, 32: 669-679.
- Chu, T.-Y., Hung, C.-C., and Hsu, C.-Y. 2005. Solid-phase microextraction for the investigation of sex pheromone of *Eucosma notanthes* Meyrick. *Talanta*, 65: 743-749.
- Espinoza, G., Gambetta, J., y Rojas, R. 2012. Identificación de una potencial feromona sexual de *Copitarsia corruda* por cromatografía de gases y electroantenografía, con miras al

- manejo integrado de plagas del espárrago. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 78: 225-232.
- Fang, Y. L., Sun, J. H., Zhao, C. H., Sun, Y. P., Zheng, H. Q., and Zhang, Z. N. 2003. Identification of sex pheromone components of *Holcocerus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) and their biological activities. *Acta Entomologica Sinica*, 46: 665-666.
- Fang, Y. L., Sun, J. H., Zhao, C. H., and Zhang, Z. N. 2005. Sex pheromone components of the sandthorn, *Holcocerus hippophaecolus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 39-48.
- Frerot, B., Malosse, C., Cain, A. H. 1997. Solid-phase microextraction (SPME): A new tool in pheromone identification in Lepidoptera. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20: 340-342.
- Golub, M. A., and Weatherston, I. 1984. Techniques for extracting and collecting sex pheromones from live insect and from artificial sources. pp. 223-285. *In*: Hummel, H. E., and Miller T. A. (Eds). *Techniques in Pheromone Research*. New York Berlin Heidelberg Tokyo. Springer-Verlag.
- Hernández-Livera, R. A., Llanderal-Cázares, C., Castillo-Márquez, L. E., Valdez-Carrasco, J., y Nieto-Hernández R. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (HAMM) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia*, 39: 539-544.
- Jing, X. Y., Zhang J. T., Luo, Y. Q., Zong, S. X., Liu, P. H., and Jia, J. X. 2010. Identification and field evaluation of the female sex pheromone of the sand salix carpenterworm, *Holcocerus arenicola* Staudinger (Lepidoptera: Cossidae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65: 403-411.
- Jones, G. R., and Holdham, J. N. 1999. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography*, 843: 199-236.
- Kenari, S. F., Faghieh, A., Imani, S., and Tabrizian M. 2011. Comparison of two different extraction techniques by SPME, in study of female specific volatile components of the iranian populations of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of Biological Research*, 2: 258-264.
- Liu, Y. X., and Meng, X. Z. 2002. Identification of sex pheromone components for *Acleris fimbriana* (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist*, 134: 511-518.

- Llenderal-Cázares, C., Nieto-Hernández, R., Almanza-Valenzuela I., y Ortega-Alvarez C. 2007. Biología y comportamiento de *Comadla redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana*, 6: 252-255.
- Ma, P. W. K., and Roelofs, W. L. 2002. Sex pheromone gland of the female european corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae): Ultrastructural and biochemical Evidences. *Zoological Science*, 19: 501-511.
- Miranda-Perkins, K., Llenderal-Cázares, C., De Los Santos-Posadas, H. M., Portillo-Martínez L., and Viguera-Guzmán A. L. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist*, 96: 1424-1433.
- Pasqualini, E., Bortolotti, A., Maini, S., Baronio, P., and Campadelli, G. 1982. *Cossus cossus* L. (Lepidoptera: Cossidae) male catches in Emilia-Romagna (Italy) with synthetic pheromone. *Colloq l'INRA Versailles* 7: 399-401.
- Pawliszyn, J. 2012. Theory of Solid-Phase Microextraction, In: *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Pawliszyn J. (Ed.), 1st ed., Elsevier Inc. Waterloo, Ontario, Canada. pp. 13-47.
- Pineda-Rios, J. M., Cibrian, T. J., Macias, S. J., Sálome, A. L. F., López R. R. M., y Arjona, S. E. J. 2016. La composición y proporción de los componentes de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) varía dependiendo de la técnica utilizada para su aislamiento. *Entomotropica*, 31: 172-185.
- Qi, Y. T., Yu, Q. T., and Fang, D. Q. 1990. Study on the sex pheromone of *Cossus mongolicus* Erschoff. *Scientia Silvae Sinica*, 26: 316-321.
- Ramamurthy, V. V., Akhtar, M. S., Patankar, N. V., Menon, P., Kumar, R., Singh, S. K., Ayri S., Parveen, S., and Mittal, V. 2010. Efficiency of different light sources in light traps in monitoring insect diversity. *Munis Entomology and Zoology*, 5: 109-114.
- Ramos-Elorduy, J., Pino, M. J., y Cuevas, C. S. 1998. Insectos comestibles del estado de México y determinación de su valor nutritivo. *Anales del instituto de biología Serie Zoología Universidad Nacional Autónoma de México*, 69: 65-104.

- Ramos-Elorduy, J., Pino, J. M., y Conconi, M. 2006. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 45: 291-318.
- Ramos, R. B., Quintero, S. B., Ramos-Elorduy J., Pino, M. J., Ángeles, C. S., y García, P. A., Barrera, G. D. 2012. Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el Estado de México. *Interciencia*, 37: 914-920.
- Reyes-García, L., Flores, M. F., Vera, W., and Bergmann, J. 2011. Biological activity of the larval secretion of *Chilecomadia valdiviana*. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 1137-1142.
- Rojas, C. J., Cruz-López, L., Malo, A. E., Díaz-Gómez, O., Calyecac, G., and Cibrián, T. J. 2006 Identification of the sex pheromone of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 99: 797-802.
- Solomon, J. D., Doolittle, R. E., and Beroza, M. 1972. Isolation and analysis of the carpenterworm sex pheromones. *Annals of Entomological Society of America*, 6: 1058-1061.
- Uehara, T., Naka, H., Matsuyama, S., Ando, T., and Honda, H. 2015. Identification of the sex pheromone of the diurnal hawk moth, *Hemaris affinis*. *Journal of Chemical Ecology* 41: 9-14.
- Zhang, J. T., Han, Y., and Meng, X. Z. 2001. Sex pheromone of the carpenterworm, *Holcocerus insularis* (Lepidoptera, Cossidae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56: 423-429.
- Zhang, J., Jin, X., Luo, Y., Li, Z., Zong, S., and Yang, M. 2009. The sex pheromone of the sand sagebrush carpenterworm, *Holcocerus artemisiae* (Lepidoptera, Cossidae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64: 590-596.
- Zhang, J., Liu, H., Zhao, W., Liu, J., and Zong, S. 2011. Identification of the sex pheromone of *Isoceras sibirica* Alpheraky (Lepidoptera, Cossidae). *Zeitschrift für Naturforsch C*, 66: 527-533.

### **Capítulo 3. Dieta artificial para cría del estado larvario de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)**

#### **Resumen**

El gusano rojo del maguey es un insecto que se comercializa y consume en estado de larva. Ha tomado importancia la reproducción controlada de este insecto debido a que su sobreexplotación ha disminuido sus poblaciones naturales, al igual que su hospedero el *Agave salmiana*. Por ello el objetivo de esta investigación fue determinar la formulación de una dieta merídica, que permita la cría del estado larvario de *C. redtenbacheri* en condiciones de laboratorio. Debido a que el éxito de una dieta requiere varios ensayos, se inició con las pruebas preliminares de tres dietas (dieta de *Acentrocne hesperiaris*, *Spodoptera frugiperda* y dieta comercial). Se decidió continuar las pruebas con la dieta de *Spodoptera frugiperda*, en la cual se probaron nueve dietas diferentes en las que se adiciono y quito algunos ingredientes, en la búsqueda de una consistencia y textura que permitieran el crecimiento y supervivencia de los instares. La última dieta merídica en la que se adicionó rizoma liofilizado del maguey y puré de manzana, permitió el desarrollo del estado larval hasta el quinto instar y se determinó que los primeros instares requieren de una dieta de consistencia blanda, mientras que conforme avanza el desarrollo de los estadios es más adecuada una de mayor consistencia.

**Palabras clave:** Cossidae, comportamiento larval, dieta merídica, formulación, consistencia y textura.

### **3. Artificial diet for raising the larval stage of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae).**

#### **Abstract**

The maguey redworm is an insect that is sold and consumed in the larval stage. The controlled reproduction of this insect has become important because its overexploitation has diminished its natural populations, as well as those of its host, *Agave salmiana*. Due to that, the objective of this research was to determine the formulation of a meridic diet that allows raising the larval stage of *C. redtenbacheri* in laboratory. Because the success of a diet requires several trials, preliminary tests of three diets were started (diet for *Acentrocneme hesperiaris*, *Spodoptera frugiperda* and commercial diet). It was decided to continue trials with the diet for *Spodoptera frugiperda*, where nine different diets were tested, to which some ingredients were added or removed, looking for a consistency and texture that allowed the growth and survival of the instars. The last meridic diet, to which lyophilized maguey rhizome and apple puree, allowed the development of the larval stage up to the fifth instar, and it was determined that the first instars require a diet of soft consistency, whereas as the development of the stadia advances, one of more consistency is more adequate.

**Keywords:** Cossidae, larval behaviour, meridic diet, formulation, consistency and texture

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El gusano rojo del maguey, larva de *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), es considerado un insecto comestible, que tiene importancia económica y alimenticia en varios estados de México, debido a su sabor se integra en diversos platillos y bebidas. (Ramos-Elorduy *et al.* 2011).

El estado de larva se desarrolla dentro de rizomas de *Agave salmiana* Otto *ex* Salm donde se alimenta y que es considerado su hospedante natural (Granados, 1993).

En la actualidad no existe reproducción en cautiverio y la forma de obtenerlo es directamente de magueyes mediante un procedimiento que consiste en elegir una planta, sacarla completamente hasta exponer sus raíces y extraer las larvas del rizoma. Forma parte de una actividad económica secundaria para la obtención de ingresos para las familias rurales. Una vez extraído de los magueyes, se vende a acopiadores, al consumidor o a establecimientos que ofrecen especialidades gastronómicas (Miranda *et al.* 2011).

La demanda que tienen las larvas de *C. redtenbacheri* va en incremento y su abastecimiento depende la mayoría de las veces de la recolección de poblaciones silvestres lo que ha ocasionado reducción de las poblaciones naturales, tal como lo reporta (van Huis 2013), en otras especies de insectos comestibles.

El desconocimiento de la biología y el comportamiento de la fase larvaria de *C. redtenbacheri*, no ha permitido el desarrollo de técnicas que lleven a un manejo con fines de producción controlada bajo normas de calidad (Llanderal *et al.* 2007). Es necesario usar estrategias que preserven tanto al insecto como a su hospedante y que permitan el aprovechamiento sustentable de este recurso en México.

Las dietas artificiales son una alternativa viable para la cría y reproducción de insectos en laboratorio. Dougherty (1959) proporcionó un conjunto de definiciones que han sido utilizadas por muchos autores para dar significados consistentes a la terminología de la formulación de dietas. El describió tres tipos de dieta; holídicas, merídica y oligídicas. Las dietas holidicas son aquellas cuyos componentes son conocidos química y estructuralmente en su totalidad, las dietas merídicas son aquellas que contienen ingredientes estructuralmente conocidos, y otros desconocidos y por último las dietas oligidicas son aquellas cuyos ingredientes no son químicamente conocidos.

La cría de *C. redtenbacheri* en una dieta merídica es una alternativa promisoriosa mediante la cual el insecto puede ser criado parcial o totalmente en su estado larvario. Existen insectos que pueden ser fácilmente criados con una dieta artificial en el laboratorio y mantenidos en altas poblaciones como es el caso de *Drosophila melanogaster* Meigen, *Bombyx mori* (L.) y de *Apis mellifera* (L.). Sin embargo, también existen insectos que requieren de estudios detallados para la cría en dietas artificiales, especialmente los que son fitófagos (Cohen 2015).

Aunque las investigaciones sobre nutrición de insectos y hábitos de alimentación comenzaron desde el año 1940, los grandes avances en técnicas de cría de insectos en dietas artificiales ocurrió en 1960, especialmente con la recopilación bibliográfica realizada por Singh (1977), quien hizo una selección de estas dietas para la cría de más de 1300 especies de insectos, en su mayoría en los órdenes lepidópteros, coleópteros y dípteros, ya que son los de mayor importancia económica.

Los barrenadores destruyen directamente los tejidos vasculares del hospedante en el alimentan y debilitan la estructura de la planta, manteniéndose en un ambiente aislado y protegido. Sus hábitos solitarios y el tiempo relativamente largo (1 a 2 dos años) de su ciclo entre generaciones complican los esfuerzos para estudiar su biología (Nielsen 1981). *C. redtenbacheri* es un barrenador y su estado de larva lo pasa dentro de rizomas de magueyes donde se alimenta y se desarrolla durante varios meses, permaneciendo oculto en sus galerías, lo que complica su estudio por la dificultad para hacer observaciones, esto se simplificaría si se contara con una dieta artificial que permita documentar el crecimiento y desarrollo de su estado de larva. Por tal motivo, la presente investigación tiene como objetivo determinar la formulación de una dieta merídica que permita la cría del estado larvario de *C. redtenbacheri* en condiciones de laboratorio tomando como referencia tres dietas conocidas.

### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. Se inició con tres dietas diferentes para observar el desarrollo de larvas de gusano rojo de maguey. La dieta uno elaborada para la cría del gusano blanco de maguey (DGBM) *Acentrocneme hesperiaris* Walker que se eligió por tener éxito para la cría de esta especie (Llenderal y López, 1994), cuyo hospedante natural es el mismo al de *C. redtenbacheri*. La dieta dos elaborada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) para el gusano cogollero (DGC), *Spodoptera frugiperda* Smith, hecha a base de ingredientes conocidos y la dieta tres, fue la comercializada para cría de guano cogollero (DCGC) y elaborada por la empresa Southland Products Inc®, su composición es desconocida. Los ingredientes y cantidades para elaborar la dieta uno y dos se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Ingredientes y cantidades para elaborar dietas artificiales para *Comadia redtenbacheri*.

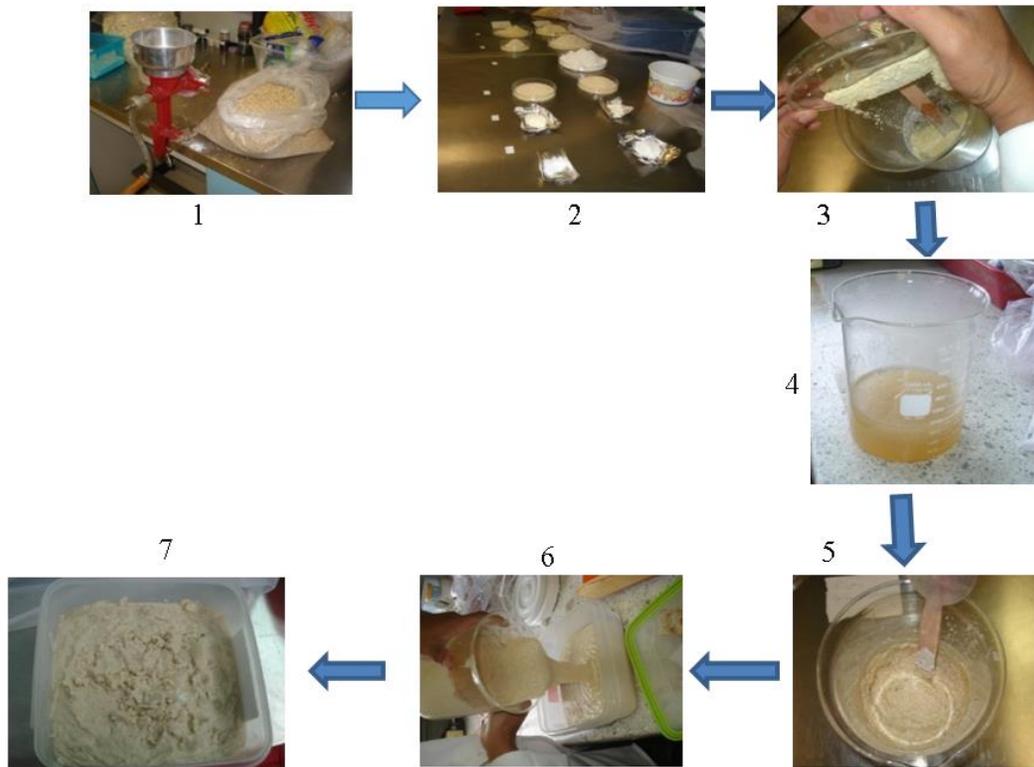
Ingredientes	Cantidad (g)	
	Dieta 2 *DGBM	Dieta 1 *DGC
Agar-agar	25	25
Ácido ascórbico	1	4
Ácido sórbico	5	1.25
Metil p-hidroxibenzoato	1	2.5
Cloruro de colina	1	2
Sulfito de sodio	2	----
Aureomicina	0.25	----
Germen de trigo	60	2
Harina de soya	40	50
Maíz opaco molido	----	96
Levadura de cerveza	----	40
Solución de vitaminas	----	5
Formaldehido 40%	----	2.5
Bagazo de maguey*	120	----
Alcohol etílico absoluto	----	6
Dieta comercial	----	----
Agua	1litro	1litro

\*DGB: Dieta para gusano blanco del maguey, \*DGC: Dieta para gusano cogollero\*En el caso del bagazo de maguey se usó rizoma fresco molido.

La dieta tres (DCGC) es comercializada en polvo y para preparar un litro de dieta se utilizó 800 mL de agua destilada, la cual se calentó hasta punto de ebullición e inmediatamente después se le agregó 200g del polvo, se agitó hasta integrar la mezcla, se dejó enfriar y se refrigeró hasta su uso.

Antes de la preparación de las dietas, algunos ingredientes fueron molidos, tamizados y pesados, después se mezcló los ingredientes hasta obtener la dieta. El procedimiento (Figura 1) para la elaborar las dietas DGBM y DGC fue el siguiente:

1. Los ingredientes como harina de soya, germen de trigo y maíz se molieron.
2. Se pesaron todos los ingredientes
3. Se diluyo 1.25 g de ácido sorbico en 7 mL de alcohol etílico, esté se acercó al fuego de 5 a 6 segundos, se retiró y agitó; se repitió la operación varias veces hasta que se disolvió en su totalidad. Está solución se mezcló con los ingredientes molidos y pesados con 400 mililitros de agua destilada
4. El agar se disolvió en 600 mililitros de agua destilada, y se calentó hasta punto de ebullición y se dejó enfriar por 5 minutos.
5. Posteriormente se integró las mezclas del paso 3 y 4. Cuando esta mezcla alcanzo una temperatura por debajo de los 40 °C se añadió las vitaminas y antibiótico (aureomicina) esto con la finalidad evitar la degradación de esto ingredientes.
6. La mezcla final se vació en un recipiente.
7. Se almacenó en refrigeración hasta su uso.



**Figura 1.** Diagrama descriptivo del proceso de preparación de dieta artificial para *Comadia redtenbacheri*

La dieta tres (DCGC) se comercializa en presentación de polvo. Para prepararla se utilizó 800 mL de agua destilada, la cual se llevó a punto de ebullición y luego se le incorporó los 200g de dieta, se agitó constantemente hasta integrar la mezcla, se dejó enfriar y se refrigeró hasta su uso.

### 3.2.1. Descripción de las larvas

En las tres dietas DGBN, DGC y DCGC se evaluó el crecimiento de las larvas de diferentes instares, las cuales se describen en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Descripción de larvas de *Comadia redtenbacheri* utilizadas para evaluar las diferentes dietas artificiales.

N° Muestra	Lugar de procedencia	Etapas de desarrollo	Descripción
1	Hueypoxtla y Pozos, Estado de Hidalgo	Larvas de tercer instar	Larvas comercializadas, obtenidas por los recolectores, sin información previa de su desarrollo.
2	Hueypoxtla y Pozos, Estado de Hidalgo y San Juan Teotihuacán, Estado de México	Larvas de segundo instar	Larvas obtenidas personalmente de rizomas de plantas de maguey de 30 cm de altura.
3	Colegio de Postgraduados Campus, Montecillo, Estado de México	Larvas recién emergidas	Larvas obtenidas de la cría en laboratorio, con información previa de su desarrollo.

Las larvas de la muestra comercial uno (Figura 2) se seleccionaron para elegir aquellas que aún no habían adquirido la coloración roja intensa típica de una larva desarrollada, que fueran móviles y sin signos de estar parasitadas o enfermas.



**Figura 2.** Larvas comerciales procedentes de Hueypoxtla y Pozos, Hidalgo, México.

Las larvas de segundo instar de la muestra dos (Cuadro 2), se extrajeron cuidadosamente de rizomas, de la base de hojas secas y entre las raíces de plantas de magueyes de 30 cm de altura, (Figura 3).



**Figura 3.** Obtención directa de larvas jóvenes de *Comadia redtembacheri* de plantas de magueyes.

De la cría mantenida en laboratorio se eligieron larvas recién emergidas para conformar la muestra tres (Figura 4).



**Figura 4.** Larvas de primer instar nacidas en laboratorio.

### 3.2.2. Descripción de los tratamientos

La prueba con larvas comerciales (Cuadro 2) consistió en colocar 200 g de dieta en frasco de vidrio de un litro (Figura 5) y luego se pusieron 100 larvas por frasco, se elaboraron cuatro repeticiones de cada dieta. El cambio de dieta nueva, evaluaciones de peso y supervivencia de larvas, formación de galerías, se hizo cada 20 días. Las tapas de los frascos se perforaron en la parte del centro y se colocó una malla metálica con el objetivo de permitir la aireación de la dieta y evitar la entrada de *Drosophila melanogaster* (Meigen) y otros organismos que tienden a depositar sus huevos en la dieta, la cuales aceleran la descomposición.



**Figura 5.** Frascos con cada una de las dietas con larvas comerciales.

Una segunda prueba con las mismas tres dieta pero con diferente tamaño de larvas (segundo instar) extraídas de plantas de magueyes (Cuadro 2). Se colocó 50 g de la dieta uno en un frasco Gerber®, otros 50 g de la dieta dos en otro frasco e igual para la dieta tres, se introdujeron 25 larvas por frasco y de cada dieta se hizo tres repeticiones (Figura 6). A las tapas de los frascos también se le hizo pequeñas perforaciones para la entrada de aire.



**Figura 6.** Frascos Gerber® con cada una de las dietas con 25 larvas (izquierda), unidad experimental (derecha).

Una tercera prueba se desarrolló con las mismas tres dietas pero con larvas de primer instar. La prueba se desarrolló en charolas para bioensayo de 32 cavidades (BIO-RT-32, C-D International Inc. Pitman, NJ. USA), con tapas auto adheribles (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-4 C-D International Inc, Pitman, NJ). Cada cavidad de la charola se utilizó como unidad experimental en la que se le colocó 10 g de cada dieta y 25 larvas, se hicieron cuatro repeticiones por cada tipo de dieta (Figura 7).



**Figura 7.** Charola de bioensayo con larvas de primer instar en tres dietas artificiales.

Las evaluaciones en las tres pruebas y dietas se hizo cada 20 días (en cada cambio de dieta) y consistió en contar el número de larvas vivas y su peso. Además, de manera visual se constató la formación de galerías.

Todos los tratamientos se mantuvieron en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo a temperatura ambiente del laboratorio y en condiciones de oscuridad.

De las pruebas preliminares de las tres dietas evaluadas, se tomó como referencia la dieta DGC para la formulación de las nueve dietas merídicas. Aunque la dieta DCGC presentó mayor supervivencia y peso de lavas, no se pudo tomar como referencia para elaborar las nueve dietas, debido a que sus ingredientes no son conocidos y además se tenía la dificultad para adquirirla.

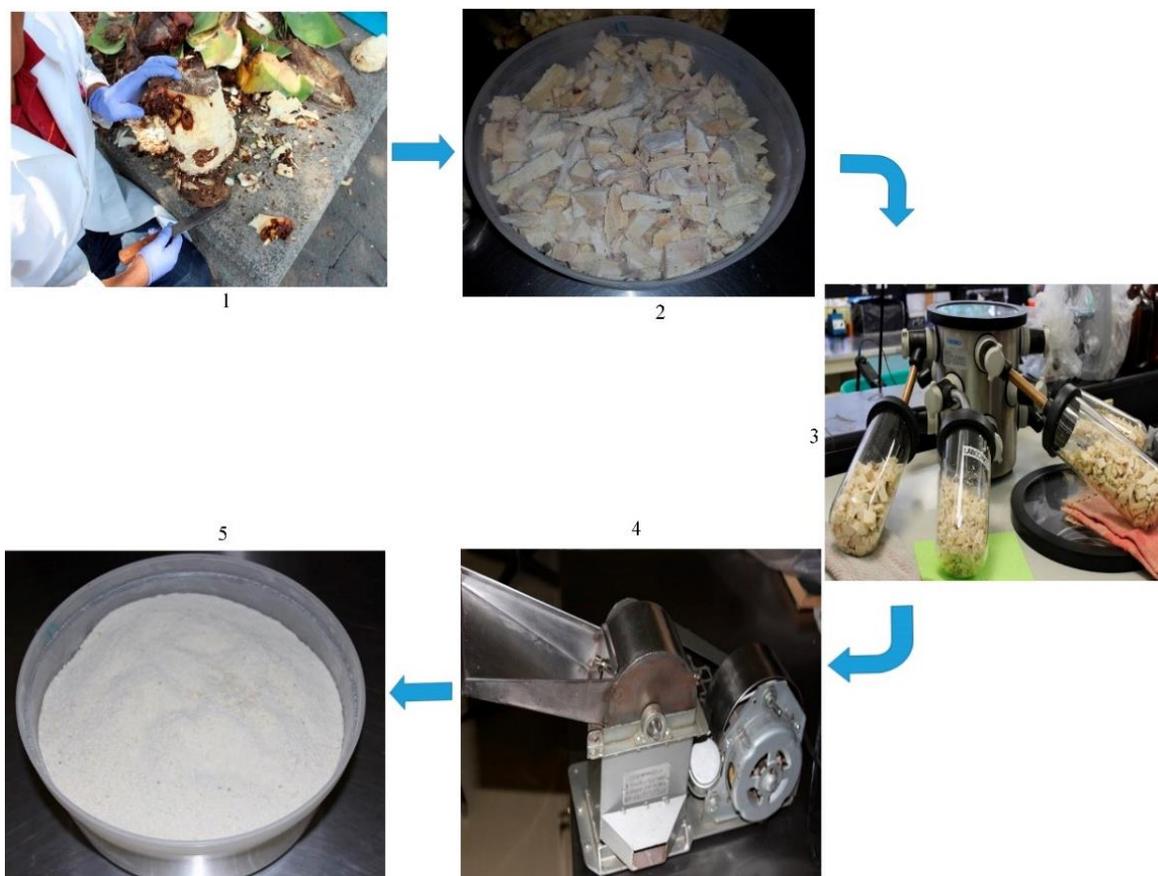
El proceso para la formulación de las nueve dietas consistió en la adición o eliminación de ingredientes de la dieta DGC, además de la variación de la proporción y contenido de cada ingrediente. Para la adición de nuevos ingredientes en todas las dietas formuladas, se tomó en base a referencias de dietas ya elaborada para otros insectos (Garcia y Haro 1986, Vargas 2009, Cohen 2004, 2015). Los ingredientes y cantidades utilizadas para cada dieta se detallan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Dietas artificiales para evaluar la cría de *Comadia redtenbacheri* con diferentes ingredientes y cantidades.

Ingredientes	*Cantidad (g <sup>l</sup> )								
	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Agar	25	20	20	20	20	20	20	20	20
Ácido sorbico	2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Metil p-hidroxi-benzoato	2.5	2	2	2	2	2	2	2	2
Auromicina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Germen de trigo	110	40	40	40	40	40	40	40	40
Propionato de calcio	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Harina de soya	110	60	60	60	60	60	60	60	60
Bagazo de maguey	---	---	---	---	120	---	---	---	---
Harina del rizoma de maguey	---	---	---	---	---	---	---	80	80
Formaldehido	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Alcohol etílico	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Maíz opaco molido	---	60	---	---	---	---	---	---	60
Celulosa	---	--	30	---	---	---	---	---	--
Sal mineral	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Inulina	---	---	---	---	---	30	---	---	--
Glucosa	30	30	30	30	30	---	30	30	30
Mezcla de vitaminas	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Manzana	---	---	---	---	---	---	150	--	150
Aceite de maíz	---	---	---	4 mL	---	---	---	---	--
Colesterol	---	---	---	0.5	---	---	---	---	--
Agua	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

\*Las cantidades mencionadas fueron para preparar 1L de dieta.

En las dietas ocho y nueve se incorporó harina del rizoma de maguey, el cual se obtuvo de la siguiente manera: 1) se cortó rizomas de magueyes en trozos pequeños, 2) se almacenó en ultracongelador por 24 horas, 3) se liofilizó durante dos días, 4) se molió en molino eléctrico y 5) se obtuvo la harina (Figura 8).



**Figura 8.** Procedimiento para obtener la harina de rizoma de maguey liofilizado.

El procedimiento para la preparación de la dieta nueve, la cual mostró avances en el desarrollo de larvas del gusano rojo del maguey es el siguiente:

1. Los granos de maíz y soya se molieron en un molino manual hasta obtener una harina.
2. La harina de soya, germen de trigo, maíz molido, maguey liofilizado, sal mineral, sacarosa, metil paraben y propionato de calcio fueron mezclados en 400 mililitros de agua destilada.
3. El ácido sórbico se mezcló en 7 mL de alcohol etílico. Se acercó la solución al fuego de 5 a 6 segundos, se retiró y agitó; se repitió la operación varias veces hasta que se disolvió en su totalidad y se adiciono a la primera mezcla.
4. El agar se disolvió en 600 mililitros de agua destilada, calentando hasta el punto de ebullición, se dejó enfriar por 5 minutos y se agregó a la primera mezcla.

5. En la dieta nueve se mezcló el colorante safranina para teñir la dieta con el propósito de observar si las larvas se alimentaban o no, además de verificar el tiempo para excretarlo lo que consumían (Figura 8).



**Figura 9.** Dieta nueve con mezcla del colorante safranina.

Las pruebas realizadas de las nueve dietas, se usaron larvas de primer instar, obtenidas de la cría de *C. redtenbacheri* en condiciones de laboratorio. Se usaron charolas de bioensayos para larvas recién nacidas (Figura 5) y frascos Gerber® (Figura 6) para larvas que alcanzaban un segundo o tercer instar después de haber estado en las charolas de bioensayo. Se usaron 25 larvas por cada dieta formulada sin repeticiones.

En el proceso para llegar a la dieta nueve se descartaron las dietas donde se obtenía mortalidad de larvas por arriba del 50% y las que presentaban supervivencia por arriba de este porcentaje se evaluaron por más tiempo.

### 3.2.3. Variables respuestas

**Sobrevivencia.** Se cuantificó el número de larvas vivas en las tres dietas preliminares, y en las últimas nueve fue por observación.

**Peso.** En las tres dietas preliminares se obtuvo el peso inicial y final durante dos meses.

**Formación de galerías.** Se observó presencia y ausencia de galerías en la dieta.

**Textura y consistencia.** Debido a las variantes de ingredientes se obtuvieron dos parámetros: blanda y sólida, textura fina. En cada cambio de dieta se observó la aceptación, sobrevivencia y apariencia de las larvas.

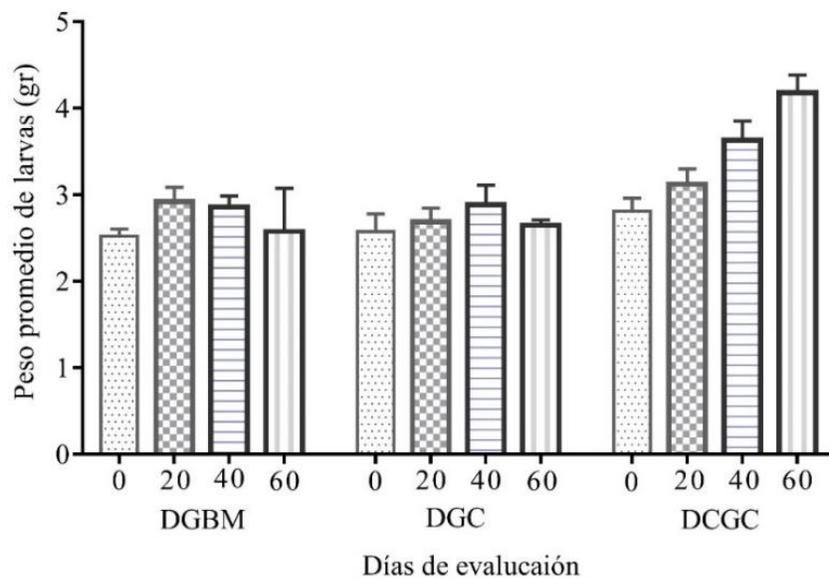
**Color y olor.** Indicadores del nivel de oxidación y fermentación para realizar el cambio de dieta.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados preliminares de las tres dietas evaluadas para la cría de larvas de *Comadia redtenbacheri* fueron: en la prueba que se hizo con larvas comerciales en las dietas DGBM, DGC y DCGC, no se logró evaluar el porcentaje de sobrevivencia, peso y formación de galerías de las larvas, debido que hubo una mortalidad del 100% en todas las dietas a los 20 días de haberlas colocado, que es cuando se hizo la primera evaluación. Estos resultados negativos con larvas comerciales se le atribuye a la manipulación que sufren las larvas durante el proceso desde que se obtienen de la planta de maguey, hasta su comercialización. Ya que cuando se usaron larvas de diferentes instares pero obtenidas directamente de plantas de maguey y larvas nacidas en cautiverio la sobrevivencia, peso y formación de galerías con las mismas dietas si se lograron evaluar. Resultado similar se encontro en otro trabajo (Miranda-Perkins *et al.* 2013), donde se probaron larvas con manipulación y sin ella de esta misma especie para inducirse a la pupación y obtener adultos, los mejores resultados se obtuvieron de las que no habían sido manipuladas. Lo cual indica que la manipulación previa de las larvas es un factor a considerar antes de realizar pruebas con dietas artificiales.

Los resultados obtenidos de la prueba con larvas extraídas de plantas de magueyes alimentados con las tres dietas (DGBM, DGC y DCGC), fueron que en la primera fecha de evaluación realizada a los 20 días, se incrementó el peso de las larvas en todas las dietas (Figura 10). Para DGBM el incremento fue de 400.6 mg, para la DGC de 112.6 mg y para DCGC de 311.1 mg, con altos porcentajes de supervivencia en todas las dietas; el 87% para DGBM, 89% DGC y 97% DCGC. En la segunda evaluación que se llevó a cabo a los 40 días fue menor para DGBM con 335.5 mg en comparación a la primera fecha y supervivencia del 67%, para la DGC el incremento de peso fue de 310.6 mg y supervivencia del 68% y para

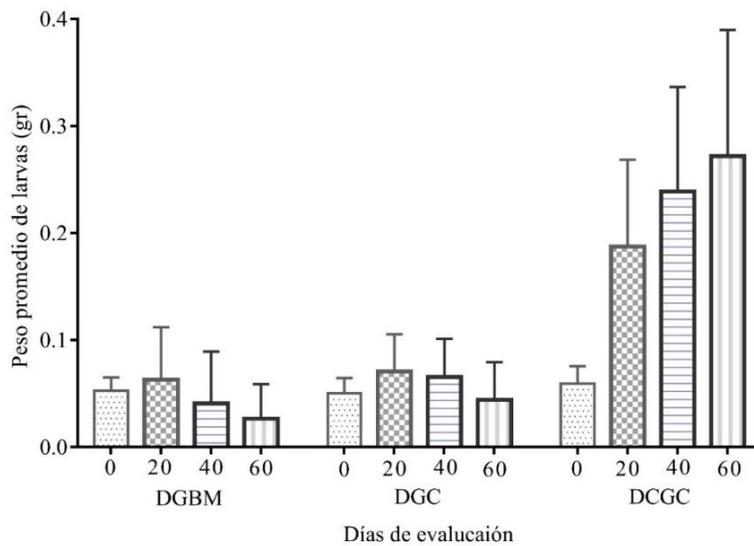
la DCGC fue de 817.7 mg y la supervivencia del 96%. Par la tercera evaluación a los a los 60 días, en la DGBM el incremento de peso fue de 54.1 mg menor en comparación a la primera y segunda evaluación y supervivencia del 55%, para la DGC el incremento fue de 73.5 mg y supervivencia del 60% y la dieta DCGC el incremento fue de 1369.4 mg y supervivencia del 95%. De las tres dietas evaluadas la de DCGC obtuvo los mejores resultados en ganancia de peso, supervivencia de larvas y formación de galerías, en la dieta de DGBM sólo hubo incremento de peso en la primera evaluación, mientras que en la dieta DGC en la primera y segunda. De las tres dietas evaluadas la de DCGC fue la que obtuvo mejor resultado en cuanto incremento de peso y alto porcentaje de supervivencia.



**Figura 10.** Peso promedio de 25 larvas de *Comadia redtenbacheri* obtenidas en plantas de magueyes, evaluadas cada 20 días.

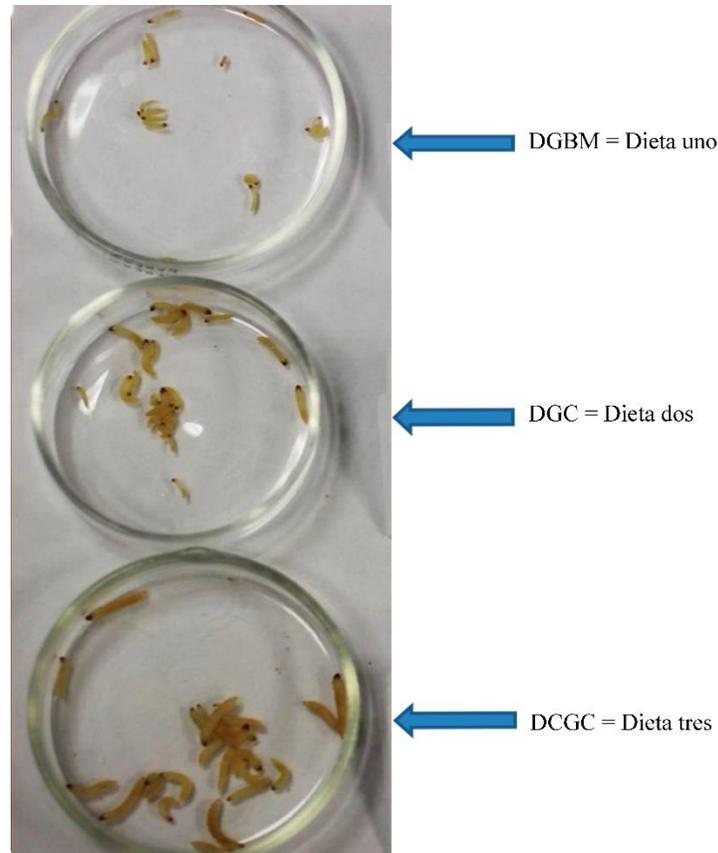
Las pruebas hechas con las tres dietas DGBM, DGC y DCGC y larvas de primer instar obtenidas de laboratorio, se logró medir el peso y supervivencia de larvas, además de la formación de galerías. En la DGBM hubo un incremento de 10.5 mg de peso promedio de 25 larvas en la primera evaluación a los 20 días, pero en la segunda y tercera fecha de evaluación a los 40 días se obtuvo reducción de peso de 11.6 mg y 26 mg con respecto a los 52 mg con que se inició. El porcentaje de sobrevivencia promedio fue de 85% en la primera evaluación, en la segunda 68% y en la tercera y última evaluación el 35%. Para el caso de la

DGC el incremento de peso promedio en la primera y segunda evaluación fue de 20.6 mg y 15.5 mg, y en la tercera hubo una reducción de peso de 6 mg. El porcentaje de supervivencia en las tres fechas de evaluación fue de 84% en la primera, 77% en la segunda y 40% en la tercera. Para la DCGC el incremento de peso promedio fue evaluado en todas las fechas, en la primera fue de 128.2 mg, en la segunda de 179.7 y la tercera de 212.6 mg. El porcentaje de supervivencia fue alto, de 98%, 94% y 93% (Figura 11). La presencia de galerías en la dieta de DCGC fue evidente, mientras que la DGC fue bajo y en la DCGC no se observó formación de galerías. De las tres dietas evaluadas durante 60 días, en la DCGC fue evidente el incremento de peso de las larvas y el alto porcentaje de supervivencia, pero las evaluaciones no continuaron debido que se terminó esta dieta y no se pudo adquirir un nuevo lote.



**Figura 11.** Peso de promedio de larvas de primer instar alimentadas con las tres dietas y evaluadas cada 20 días.

El crecimiento y desarrollo de las larvas de primer instar criadas en las dietas de DGBM, DGC y DCGC fue evidente, además de la tasa de supervivencia en cada una de ellas (Figura 12).



**Figura 12.** Larvas emergidas en laboratorio alimentadas en las tres dietas, observadas a los 60 días.

La dieta de DCGC fue la que incremento el peso de larvas y obtuvo bajo porcentaje de mortalidad, sin embargo no se conocen los ingredientes y cantidades para prepararla, por lo que se decidió modificar la dieta de DGC recomendada para gusano cogollero, la cual se tomó como referencia para elaborar las nueve dietas artificiales.

En la dieta uno, se eliminó ácido ascórbico, harina de maíz, levadura de cerveza, y cloruro de colina y se incrementó el germen de trigo, y se adicionó sal mineral, sacarosa, propionato de calcio y aureomicina. Durante el primer mes de evaluación se observó formación de galerías (Figura 13) pero poco desarrollo de las larvas, que progresivamente se fueron muriendo con el paso de los días. En esta dieta la consistencia fue demasiado blanda y con un alto contenido de agua, posible causa del rechazo para alimentarse de las larvas.



**Figura 13.** Formación de galerías por larvas de primer instar.

Para la dieta dos se le adicionó harina de maíz con la finalidad de mejorar la consistencia y se redujo la cantidad de agar, se obtuvo resultados favorables en la consistencia. Se observó la construcción de galerías y la oxidación y fermentación fue similar a la dieta uno, pero las larvas también murieron de manera progresiva al paso de los días. Aunque en esta dieta se mejoró la consistencia y el contenido de agua.

En la dieta tres se adicionó el ingrediente celulosa, el cual mejoró la consistencia de la dieta, la oxidación y fermentación, y el cambio se hizo a los 35 días sin problema alguno, sin embargo, las larvas no se alimentaron, no formaron galerías y en el segundo cambio de dieta el porcentaje de supervivencia fue del 10%, motivo por el cual esta dieta fue descartada y eliminada.

En la dieta cuatro se adicionaron los ingredientes aceite de maíz y colesterol, ya que estos ingredientes son recomendados en otras dietas de insectos (Cohen, 2004). Se hizo las evaluaciones y después de dos meses de observaciones el porcentaje de supervivencia fue del 40%, no se observó formación de galerías, pero si la oxidación y fermentación de la dieta se presentó a los 25 días, lo cual se tenía que realizar los cambios de dietas más pronto que el resto de las demás, esta dieta también fue descartada después de 2.5 meses de observaciones.

En la dieta cinco, se adicionó fibra de maguey fresco como fagoestimulante, lo que modificó la consistencia de la dieta en demasiado blanda, debido al alto contenido de agua

presente en la fibra de maguey fresco, por tal motivo las larvas *C. redtenbacheri* colocadas en esta se ahogaron y el porcentaje de supervivencia de larvas fue nula, esta dieta fue eliminada. La incorporación o combinaciones de materiales frescos en dietas para la cría de insectos no han funcionado, experiencias de este tipo son reportadas por Reinecke (1985) quien no recomienda hacer combinaciones o mezclas como materiales frescos, más agua y un agente gelificante ya que modifica la consistencia de la dieta a más blanda debido al alto contenido de agua, y en una dieta artificial encontrar y mantener un contenido apropiado del líquido es difícil para obtener la consistencia adecuada en una dieta. El exceso de agua causa cambios adversos en la consistencia y palatabilidad (Howell 1977).

En la dieta seis, se añadió el ingrediente inulina, que está presente en los rizomas de plantas de maguey donde se alimenta el estado larval de *C. redtenbacheri*, no indujo incremento y desarrollo de las larvas, aunque se observaron algunas galerías en la dieta pero finalmente se descartó.

Para el caso de la dieta siete, al adicionar puré de manzana la hizo ligeramente más blanda y las larvas de primer instar formaron galerías y mostró incremento de peso. Por lo cual se incrementó el tiempo de observación has tres meses cuando el porcentaje de supervivencia se redujo por debajo del 50%.

En la dieta ocho, se agregó harina rizoma de maguey liofilizado como un fagoestimulante con el fin de inducir la alimentación de las larvas. Se mejoró la consistencia y textura de la dieta, siendo esta de mayor preferencia por larvas de instares más avanzados. Hubo formación de galerías, la supervivencia de larvas fue mayor al 50% durante la evaluación por 3 meses. Es probable que este ingrediente haya funcionado como un fagoestimulante en esta dieta, tal como menciona Reinecke (1985) que a pesar de que una dieta artificial sea nutricionalmente adecuada, no es suficiente para que el insecto se alimente, lo que es común en muchos insectos monófagos tal como las larvas del gusano rojo de maguey, los cuales requieren de fagoestimulantes para inducir la alimentación y de preferencia en aquellos insectos que se resisten a consumir dietas artificiales. Otro éxito de similar de cuando se agrega un fagoestimulante natural para que las larvas se alimenten de la dieta artificial, es lo que reporta Gindin *et al.* (2009) quien logró que las larvas de *Capnodis*

*tenebrionis* L. y *C.apnodis carbonaria* se alimentaran, fue cuando incorporó corteza de ciruelo y melocotón, árboles de los cuales se alimentan estas larvas.

En la dieta nueve se incorporaron los ingredientes que aportaron una ligera mejoría en las dietas anteriores como el maíz molido, el puré de manzana y el maguey liofilizado. Al incorporar estos ingredientes en la dieta nueve se observó buena consistencia, formación de galerías e incrementó el tamaño de larvas, además de que se redujo la oxidación y la fermentación por más tiempo, lo que permitió cambiar la dieta cada 30 días. Logrando el desarrollo de las larvas de primer hasta su quinto instar (Figura 14).



**Figura 14.** Formación de galerías de larvas de primero y quinto instar en la dieta nueve.

Estos resultados obtenidos para elaborar la dieta nueve para las arvas del gusano rojo de maguey concuerdan por sugeridos por Vanderzant (1974), quien recomienda que si se pueden hacer dietas artificiales para muchos insectos, a partir de cambiar diferentes ingredientes conocidos, complementados con el material vegetal huésped para satisfacer los nutrientes desconocidos o estimulantes para la alimentación del insecto en estudio, principalmente en los insectos monófagos.

La dieta nueve se debe preparar con dos consistencias diferentes para la alimentación de larvas de *C. redtenbacheri*, ya que el primero y segundo instar requieren de una dieta de consistencia blanda y el resto de los instares otra de consistencia más rígida. El tipo de consistencia que prefieren los diferentes instares de larvas de gusano rojo de maguey no es

un caso aislado cuando se elabora una dieta, ejemplo de esto lo determinaron Gindin *et al.* (2009), quienes elaboraron una dieta para larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* L. y *Capnodis carbonaria* Klug con una consistencia blanda para los primeros instares y después del tercer instar una de consistencia sólida.

La dieta nueve mostró mejores resultados que las otras dietas, debido a que se logró el desarrollo del estado larvario del primero hasta el quinto instar, con 50% de supervivencia. Sin embargo, no fue posible obtener los dos últimos instares y es probable que la dieta haya tenido deficiencia de algunos macronutrientes. Las evaluaciones se hicieron durante un periodo de seis meses. Las larvas que se desarrollaron en esta dieta hasta el quinto instar no presentaron el olor y color rojo característicos de cuando se alimentan de su hospedante natural (*A. salmiana*) (Figura 15). Resultados similares a los encontrados en la modificación del color de larvas de *C. redtenbacheri*, es decir la ausencia de estas características se han detectado en otras especies cuando se alimentan con dieta artificial, tales casos se ha presentado en especies como *Z. pyrina*, la cual adquirió un color claro en lugar del rosado (Navon 1966) y *Prionoxystus robiniae* Peck que tampoco tomó su color rojo, ni el olor característico de esta especie (Forschler y Nordin (1989).



**Figura 15.** Larvas blancas de quinto instar, en dieta nueve.

Otro aspecto importante a cuidar en la elaboración de la dieta de *C. redtenbacheri* es la textura y consistencia, tal como lo reportan Singh (1977) y Singh y Moore (1985) quienes recomiendan tener cuidado en la textura y consistencia de las dietas artificiales para insectos al momento de elaborarlas, ya que esto puede influir en el éxito o fracaso de una cría en dieta. Por su parte Daubert *et al.* (2015) mencionan que uno de los desafíos para elaborar dietas artificiales es la dificultad de encontrar la textura y consistencia adecuada para cada especie que se desee criar debido a que existe una amplia gama de alimentación de insectos, que muchas veces se logra formular una dieta a través de la combinación de varios ingredientes tal como se logró obtener la dieta nueve, en la cual se hicieron combinaciones de varios ingredientes y se logró una consistencia favorable para la cría de 5 instares larvales de *C. redtenbacheri*, lo que da una base para continuar y perfeccionar una dieta artificial en la cual se pueda completar de desarrollo del estado larario del gusano rojo de maguey.

La consistencia de las dietas artificiales es regulada comúnmente con el agar. Sin embargo, Dyck (2010) logró una mejor consistencia de la dieta para la cría de *Cydia pomonella* Howell, cuando elimino el agar y los sustituyo por aserrín y virutas de madera, mejoró la consistencia de la dieta e incrementó el desarrollo de las larvas. Abbasi *et al.* (2007), también mejoro la dieta de *Helicoverpa armigera* Hubner cuando remplazo el agar por tapioca y obtuvieron resultados similares a los del agar, con la diferencia en reducción de costos. Por su parte Navon (1977) observó que cuando redujo al 1% la cantidad de agar en la dieta artificial para *Z. pyrina* e incrementó la cantidad de pulpa de remolacha azucarera, mejoró la consistencia de la dieta y redujo costos.

Estos factores ponen en evidencia que en una dieta artificial no basta con encontrar y determinar los ingredientes ideales, si no que se debe de tener cuidado de los ingredientes responsables de darle la consistencia y la textura de la dietas, ya que el fracasar puede ocurrir por el simple hecho de que el ingrediente este caducado , tal como lo indica Cohen (2015) que en un sistema de producción de cría de insectos perfectamente establecido puede llegar al fallar la textura o consistencia con el agar por tres causas principales: 1) la llegada de un lote nuevo de agar defectuoso que no gelifique correctamente con la temperatura establecida para su elaboración, 2) que el agar esté bien pero el equipo donde se elabora tenga un mal funcionamiento, y 3) un error del operador en la programación de la temperatura indicada

para la perfecta gelificación que puede modificar la consistencia. Estas tres causas en el proceso de elaboración del agar puede provocar que la dieta artificial sea blanda y no alcance los intervalos de consistencia deseados, provocando que los insectos no se alimenten adecuadamente y es posible que las larvas se ahoguen al intentar alimentarse, incluso, si hay sobrevivientes el desarrollo se verá afectado, además del colapso de las galerías que los insectos forman cuando existe una mala gelificante en la dieta evidente.

Cuando se elaboraron dietas para *C. redtenbacheri* con bagazo de maguey fresco, los resultados fueron negativos, mientras que cuando se adicionó el maguey liofilizado la consistencia de la dieta mejoró y se incrementó el peso de larvas y la formación de galerías.

Cuando se mezcló el colorante safranina en la dieta nueve, se observó que a los 15 días comenzó la tinción del intestino de las larvas y a los 30 días la pigmentación roja en el intestino de las larvas fue evidente (Figura 16). Después de un mes de observación, las larvas fueron devueltas en la dieta sin el colorante y el proceso de pérdida del color adquirido fue reversible, es decir de la misma forma y tiempo de cómo lo adquirió. Esta observación nos indica que la alimentación de las larvas de *C. redtenbacheri* es lento, aunque se existe otros factores como temperatura y humedad que deben ser controlados durante el proceso de cría y descartar que no son estos los que afectan la lenta alimentación de las larvas o si es por falta de nutrientes en la dieta, tal como lo reportan More y Navon (1966) quienes determinaron que el rápido crecimiento de larvas de *Z. pyrina* fueron debido a los nutrientes presentes en la dieta artificial.



**Figura 16.** Larvas alimentadas con safranina después de 30 días.

Otros factores abióticos importantes a considerar son temperatura, humedad y fotoperiodo para tener éxito en la cría de insectos. Bartlett (1984) menciona que una vez que los insectos son llevados del campo hacia un laboratorio aumenta la mortalidad, debido a los cambios de estos factores a los que se enfrenta cuando son mantenidos en cautiverio. Por lo cual es necesario tener estudios previos de los intervalos de humedad, temperatura y fotoperiodo a los que vive el insecto en condiciones de campo antes de ser llevado al laboratorio. Las condiciones de cría de insectos en laboratorio por lo general son estables y homogéneas y si estas condiciones no son las adecuadas para los insectos a estudiar afectaría su óptimo desarrollo en una dieta y no sería el problema de la dieta, sino de las condiciones de las instalaciones.

Véjar (2004), considera que los factores de mayor importancia para un insectario son la temperatura, humedad, fotoperiodo y ventilación. La humedad es indispensable para evitar la deshidratación de los estados de desarrollo de insecto, al igual que en las dietas artificiales. El fotoperiodo regula las actividades fisiológicas diarias o estacionales y, con frecuencia, la intensidad de luz que recibe un insecto en cautiverio no es suficiente para satisfacer sus necesidades. Una buena ventilación también es importante para controlar las condiciones sanitarias, evitando malos olores y desarrollo de otros microorganismos.

García y Haro (1986) reportan que en la cría exitosa de *Z. pyrina* en dieta artificial los factores temperatura y humedad fueron controlados con la ayuda de una cámara bioclimática. En la búsqueda de la dieta artificial para la cría de *C. redtenbacheri* estos factores no fueron controlados en laboratorio. Es decir que durante los cambios de la dieta durante las pruebas se encontraron temperaturas a intervalos de 5 °C y 25 °C.

La temperatura es importante en la duración del ciclo de vida del insecto, es decir, si es baja se alarga y si es alta se acelera. Moore y Navon (1966) y Tsourgianni (1985), reportan que *Z. pyrina*, en condiciones naturales, completa su ciclo de vida en un año, pero cuando fue criada en dieta artificial su ciclo fue de cuatro meses y podría acortarse más aumentando la temperatura en todo el proceso de cría. Es probable que el retraso del crecimiento del estado larval del gusano rojo en dieta artificial en condiciones de laboratorio se atribuya a este factor, el cual no se controló. Gindin *et al.* (2009) reportan que el 80% de las larvas de

*C. tenebrionis* alimentadas en dieta artificial a 28 °C se desarrollan en 3 meses, pero cuando se modificó la temperatura a 24 °C se alargó de 10 a 12 meses.

### **3.4. CONCLUSIONES**

La dieta merídica 9 (Cuadro 3) permitió la cría del estado larvario de *Comadia redtenbacheri* hasta el quinto instar en condiciones de laboratorio y constituye una base para continuar estudios posteriores.

Las larvas alimentadas con dieta artificial requieren de una consistencia blanda en sus primeros instares y de consistencia más rígida a medida que avanza el estado larval.

Se deben usar larvas de primer instar, recién emergidas para que se adapten mejor a las características de la dieta artificial. No es recomendable usar larvas comerciales, ya que su manipulación previa afecta la supervivencia en las dietas.

La alimentación de larvas de gusano de maguey en dieta artificial en condiciones de laboratorio es lenta.

#### **Comentarios y sugerencias**

Es importante controlar la humedad relativa, temperatura y luz dentro de las instalaciones de cría. Estos factores pueden limitar e influir de manera negativa en la cría de insectos si no se establecen adecuadamente.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Abbasi, B., Ahmed, K., Khalique, F., Ayub, N., Liu, H., Kazmi, S., Aftab, M. 2007. Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. *Journal of Insect Science*, 7:1-7.
- Bartlett, A. C. 1984. Genetic changes during insect domestication. pp. 2-8. *In: Advances and Challenges in Insect Rearing*. King E. G., and Leppla, N. C. (Eds.), USDA/ARS, New Orleans.
- Cohen, C. A. 2015. *Insect Diets: Science and Technology*. Second Edition. Rearing Institute, LLC Tucson, Arizona. CRC Press, Boca Raton, London New Yorks, USA. 439 p.
- Cohen, C. A. 2004. *Insect Diets: Science and Technology*. Rearing Institute, LLC Tucson, Arizona. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 324 p.
- Doubert, C., Pernell, C., and Cohen, C. A. 2015. Introduction to texture, consistency, and rheology in insect diets. pp: 319-331. *In: Insect Diets: Science and Technology*. Cohen A. C. (ed.), second edition. Rearing Institute, LLC Tucson, Arizona. CRC Press, Boca Raton, London New Yorks, USA.
- Dougherty, E. C. 1959. Introduction to axenic culture of invertebrate metazoan: A goal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 77: 27-54.
- Dyck, V. A. 2010. *Rearing Codling Moth for the Sterile Insect Technique*. FAO and IAEA, Rome, Italy. 199 p.
- Forschler, T. B., and Nordin, G. L. 1989. Techniques for rearing the wood borers *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae) and *Paranthrene dollii* (Lepidoptera: Sesiidae). *Florida Entomologist*, 72: 224-226.
- García, Del P., F., y Haro, A. 1986. Cultivo en el laboratorio en una dieta artificial del taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L. (Lepióptera cossidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 12: 281-289.
- Gindin, G., Kuznetsova, T., Protasov, A., Ben Y. S., and Mendel, Z. 2009. Artificial diet for two flat-headed borers, *Capnodis* spp. (Coleoptera: Buprestidae). *European Journal of Entomology*, 106: 573-581.
- Granados, D. S. 1993. *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 252 p.

- Howell, J. F. 1971. Problems involved in rearing the codling moth on diet in trays. *Journal of Economic Entomology*, 64: 631-636.
- Howell, J. F. 1977. Codling moth: Agar substitutes in artificial diets. USDA. ARS-W, 43: 1-9.
- Llenderal, C. C., y López, A. M. S. 1994. Cría del gusano blanco del maguey *Acentrocneme hesperiaris* (Lepidoptera: Megathymidae) en una dieta artificial. *Agrociencia*, 5: 45-52.
- Llenderal-Cázares, C., Nieto-Hernández, R., Almanza-Valenzuela, I., y Ortega-Álvarez, C. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm.) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana*, 6: 252-255.
- Miranda, R. G., Quintero, S. B., Ramos, R. B., y Olguín-Arredondo, H. A. 2011. La recolección de insectos con fines alimenticios en la zona turística de Otumba y Teotihuacán, Estado de México. *PASOS: Revista de Turismo y Patrimonio Cultural*, 9: 81-100.
- Miranda-Perkins, K., Llenderal-Cázares, C., De Los Santos-Posadas, H. M., Portillo-Martínez, L., and Viguera-Guzmán, L. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist*, 96: 1424-1433.
- Moore, I., and Navon, A. 1966. The rearing and some bionomics of the leopard moth, *Zeuzera pyrina* L., on an artificial medium. *Entomophaga*, 11: 285-296.
- Navon, A. 1977. Rearing of the leopard moth, *Zeuzera Pyrina* L., on an improved diet. *Phytoparasitica*, 5:38-40.
- Nielsen, D. G. 1981. Studying biology and control of borers attacking woody plants. *Entomological Society of America*, 27: 251-259.
- Ramos-Elorduy, J., Pino, J. M., y Conconi, M. 2006. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 45: 291-318.
- Reinecke, J. P. 1985. Nutrition: Artificial diets. pp. 391-419. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A., and Gilbert, L. I. (eds.). Vol. 4. Pergamon Press, Inc. Oxford. New York USA.

- Singh, P. 1977. Artificial diets for insects, mites, and spiders. IFI/Plenum Press, New York. USA. 594 p.
- Singh, P., and Moore, R. F. 1985. The Handbook of Insect Rearing, Vol. I. Elsevier. New York. 474 P.
- Tadros, A. W., Abdel, R. A. M., and Abdel-Moaty, R. M. 2003. Rearing fruit borers on natural hosts and artificial médium diets: 1-*Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae). Egyptian Journal of Agricultural Research, 81: 1535-1548.
- Tsourgianni, A. 1985. Rearing of *Zeuzera pyrina* L. on artificial medium. Annales de l' Institut phytopathologique Benaki, 14: 111-115.
- Vanderzant, E. S. 1974. Development, significance, and application of artificial diets for insects. Annual Review of Entomology, 19: 139-160.
- Vargas, V., C. G. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis de Grado. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional IPN-Michoacán. México. 123 p.
- Véjar, C. G. 2004. Importancia e infraestructura para mantener crías de insectos. pp. 3-16. *In: Cría de Insectos Plaga y Organismos Benéficos*. Bautista- Martínez, N., Bravo-Mojica, H., y Chavarín-Palacio, C. (Eds.) CONABIO, México, D. F., México.