



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



**Actividad antialimentaria y efecto tóxico del extracto
vegetal de *Melia azedarach* L. sobre larvas del tercer
estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) Lambayeque,
Enero- Junio 2013**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. Stefany Anali Mimbela Gonzales

LAMBAYEQUE, PERÚ
2013

**Actividad antialimentaria y efecto tóxico del extracto vegetal de
Melia azedarach L. sobre larvas del tercer estadio de *Spodoptera
frugiperda* (Smith) Lambayeque, Enero- Junio 2013**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dr. César Estela Campos

PRESIDENTE

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIO

Dra. Marlene Cardozo Quinteros

VOCAL

Dra. Carmen Calderón Arias

PATROCINADORA

**LAMBAYEQUE, PERÚ
2013**

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1. Cultivo de <i>Zea mays</i> L. "maíz" y su importancia.....	4
2.2. Principales plagas del maíz.....	5
2.3. <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith); Lepidoptera, Noctuidae.....	6
2.4. Insecticidas botánicos.....	8
2.4.1. Antecedentes de la actividad de extractos vegetales de <i>Melia azedarach</i> L. en el control de insectos.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Materiales.....	14
3.1.1. Material botánico.....	14
3.1.2. Material biológico.....	14
3.1.3. Población y muestra de estudio.....	14
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	15
3.2.2. Lugar de muestreo.....	15
3.2.3. Colecta en campo y acondicionamiento en laboratorio.....	18
a) Colecta en campo.....	18
b) Acondicionamiento de larvas.....	18
c) Acondicionamiento de pupas.....	20
d) Manejo de adultos.....	20
3.2.4. Obtención de larvas del tercer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith).....	25
- Determinación del estadio larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) para desarrollo de bioensayos.....	25
3.2.5. Obtención de discos foliares para los bioensayos.....	28
3.2.6. Preparación de extractos vegetales.....	30
a) Acondicionamiento del Material Vegetal para la preparación de los Extractos.....	30
b) Preparación de los Extractos Acuosos Crudos.....	30
3.2.7. Bioensayos.....	30
3.2.7.1. Ensayos de preferencia.....	30

3.2.7.2.	Ensayos sin posibilidad de elección.....	35
3.2.7.3.	Ensayos nutricionales.....	38
IV.	RESULTADOS.....	70
4.1.	Nueva metodología de crianza de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) con dieta artificial en condiciones de laboratorio.....	40
4.2.	Evaluación del efecto antialimentario de los extractos vegetales de <i>Melia azedarach</i> L. sobre el consumo de hojas de maíz utilizando bioensayos de preferencia.....	45
4.3.	Medición del efecto tóxico de los extractos vegetales de <i>Melia azedarach</i> L. sobre larvas del tercer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) utilizando ensayos sin posibilidad de elección.....	49
4.3.1.	Evaluación del consumo diario (en % de área foliar) por las larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) durante los 25 días de duración de los ensayos.....	49
4.3.2.	Evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas durante los 25 días de duración de los ensayos.....	53
4.3.3.	Evaluación de los índices nutricionales obtenidos durante los 25 días de duración de los ensayos.....	55
V.	DISCUSIÓN.....	58
VI.	CONCLUSIONES.....	67
VII.	RECOMENDACIONES.....	68
VIII.	RESUMEN.....	69
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

Índice de tablas

Tabla 1.	Posición de los campos de <i>Zea mays</i> L. “maíz” donde se realizó el muestreo de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) abril - junio de 2013.....	17
Tabla 2.	Composición de la dieta artificial utilizada para la cría de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) (modificada de Murúa, 2003).....	44
Tabla 3.	Duración de cada estado de desarrollo de <i>Spodoptera frugiperda</i> 24°C.....	45
Tabla 4.	Porcentaje (%) de consumo foliar de los semicírculos de maíz por larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) durante los Ensayos de Preferencia en tres diferentes concentraciones (24 horas).....	47
Tabla 5.	Índices de Inhibición Antialimentaria (IIA%) obtenidos en los Ensayos de Preferencia empleando diferentes concentraciones de extracto de hojas de <i>Melia azedarach</i> L. sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith). Promedios (\pm error estándar) de 25 réplicas por concentración.....	48
Tabla 6.	Índices nutricionales (en tasas y porcentajes) obtenidos durante los 25 días de duración de los ensayos. Cada valor corresponde al promedio de 15 réplicas (\pm error estándar).....	57

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación geográfica de la zona de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, Región Lambayeque. Abril-Junio 2013.....	16
Figura 2.	Planta de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en campos de cultivo de Reque con presencia del gusano plaga.....	19
Figura 3.	Las larvas colectadas en microjaula plástica para transporte del campo al laboratorio.....	19
Figura 4.	Unidades de crianza de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) en el Centro de Altos Estudios en Biotecnología- Lambayeque.....	21
Figura 5.	Desinfección de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) con una solución de lejía.....	21
Figura 6.	Pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) en envases con algodón humedecido para control de humedad.....	22
Figura 7.	Jaula de apareamiento <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith).....	22
Figura 8.	Macetas/bolsa con maíz en el interior de las jaulas de apareamiento.....	23
Figura 9.	Identificación y sexaje de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) con el apoyo de un estereoscopio.....	23
Figura 10.	Pupas sexadas a punto de eclosionar en macetas dentro de la jaula de apareamiento.....	24
Figura 11.	Identificación de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith)....	24
Figura 12.	Eclosión de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) en unidades de crianza.....	26
Figura 13.	Preparación de la dieta artificial de Murúa (2003) para <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) modificada.....	26

Figura 14.	Lava de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) alimentándose de dieta artificial.....	27
Figura 15.	Observación al estereoscopio de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith).....	27
Figura 16.	<i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro, sembrado en el invernadero del Centro de Altos Estudios en Biotecnología de la UNPRG.....	29
Figura 17.	Hojas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro para la realización de los bioensayos.....	29
Figura 18.	Colecta de hojas de <i>Melia azedarach</i> L. de las plantas establecidas en el campus de la UNPRG.....	31
Figura 19.	Lavado de hojas de <i>Melia azedarach</i> L.....	31
Figura 20.	Machacado de hojas de <i>Melia azedarach</i> L.....	32
Figura 21.	Maceración de hojas de <i>Melia azedarach</i> L. machacadas por 24 horas en frascos ámbar.....	32
Figura 22.	Pruebas de elección para determinar el efecto antialimentario de los extractos de <i>Melia azedarach</i> L.....	34
Figura 23.	Semicírculos control y tratamiento en cajas Petri con larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) para ensayos de preferencia...	34
Figura 24.	Ensayos sin posibilidad de elección.....	36
Figura 25.	Peso de la hoja de maíz previo a la realización de los bioensayos para ensayos nutricionales.....	36
Figura 26.	Bioensayos para la evaluación del efecto antialimentario y tóxico del extracto de <i>Melia azedarach</i> L.....	37
Figura 27.	Larvas privadas de alimento.....	37
Figura 28.	Porcentaje de mortalidad de los ejemplares de <i>Spodoptera frugiperda</i> criados en el Centro de Altos Estudios en	

Biotecnología.....	41
Figura 29. Larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) necrosada.....	42
Figura 30. Larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) atacada por el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	42
Figura 31. Ensayos de Preferencia para la evaluación del efecto antialimentario.....	46
Figura 32. Valores de los Índices de Inhibición Antialimentaria (IIA%) obtenidos en los Ensayos de Preferencia empleando tres diferentes concentraciones de extracto de hojas de <i>Melia azedarach</i> L. sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith).....	48
Figura 33. Consumo diario (en % de área foliar) por las larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) alimentadas con diferentes concentraciones de extracto hojas de <i>Melia azedarach</i> y Larvin durante los 25 días de duración de los ensayos. P: Día en que las larvas comenzaron a pupar.....	51
Figura 34. Consumo promedio acumulado (% de área foliar) de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) alimentadas con diferentes concentraciones de extracto hojas de <i>Melia azedarach</i> L. y Larvin durante los 25 días de duración de los Ensayos.....	52
Figura 35. Mortalidad acumulada (porcentaje) de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas con diferentes concentraciones de extracto de hojas de <i>Melia azedarach</i> L. y Larvin durante los 25 días de duración del bioensayos.....	54
Figura 36. Datos tomados en Ensayos de Preferencia para la evaluación de los índices nutricionales.....	56

I. INTRODUCCIÓN

El “maíz”, ***Zea mays* L.**, es un cultivo que está diseminado en todo el ámbito nacional, ocupando el 14% del área cultivada. Es un componente básico de la alimentación humana y animal (Valdiviezo y Nuñez, 1989). La actividad agrícola en la región Lambayeque depende principalmente de cinco cultivos, entre los que se encuentra el maíz (INEI, 2010); sin embargo, las plagas de insectos son el mayor obstáculo para incrementar la productividad de este cultivo. Las pérdidas provocadas por las plagas y el costo de los insecticidas para combatirlas suponen para los agricultores un gasto anual de 5 mil millones de dólares (Angulo, 2004).

La plaga principal de esta gramínea es conocida como “cogollero del maíz” ***Spodoptera frugiperda* Smith** (Lepidoptera; Noctuidae), especie polifitófaga con amplia distribución geográfica, que prefiere hojas y brotes tiernos de maíz, especialmente los cogollos (Sosa, 2002). Herrera (1979) la reporta atacando durante toda la etapa del crecimiento inicial de la planta, pudiendo reducir la producción hasta en 40%. Esta plaga también ataca otros cultivos como arroz, algodón, sorgo, trigo, avena, caña de azúcar, pastos, ajonjolí, soya, tabaco, plantas hortícolas, ciprés, papa, berenjena, crisantemo, y mucho más (Gallego 1946, Vélez 1997).

El método de control comúnmente utilizado es el uso de sustancias químicas, que desequilibran los ecosistemas, destruyen los organismos benéficos y permiten que la plaga desarrolle poblaciones resistentes a los insecticidas por lo que es necesario aumentar su aplicación y dosis, incrementando los costos de producción (Valicente y Cruz, 1991). Además, el uso de estos potentes productos causa el surgimiento de nuevas especies plagas y representa para los animales salvajes, domésticos, aves, peces y aún para el mismo hombre, un peligro mortal (Castro, 2008). La principal causa de estos problemas son las “dioxinas”, sustancias químicas tóxicas que son subproductos que se originan al fabricar, utilizar y verter cloro o productos químicos derivados del cloro como plaguicidas (Allsopp, 1994) que debido a su alta actividad biológica y su persistencia en el ambiente, puede causar efectos adversos a la salud humana y al ambiente (Benerjee 1999, Maroni et al. 1999).

Desde hace varios años, diversas plagas se están combatiendo mediante otros métodos y los productores están substituyendo a los insecticidas por alternativas más ventajosas, como el Manejo Integrado de Plagas (MIP). La reducción de las poblaciones plaga, como los insectos del maíz, requiere un manejo integrado de plagas con fundamento ecológico (Núñez, 2008), en donde los extractos de plantas podrían constituir un método adecuado, aplicando las normas de Buenas Prácticas Agrícolas (Fuertes *et al.*, 2010).

El uso de los extractos vegetales en el control de plagas agrícolas era una práctica ancestral ampliamente utilizada, hasta la aparición de plaguicidas sintéticos, pero problemas como la contaminación y la resistencia por parte de los insectos han hecho que hoy en día vuelvan a ser tomados en cuenta por ser de potencial ayuda para el control de insectos (Soberón, 2004; Weinziere & Henn, 1992). Con el fin de encontrar otra alternativa a los insecticidas sintéticos aplicados en el cultivo del maíz, usando sustancias inocuas que permitan un manejo integrado de plagas con fundamento ecológico, se hace necesario incentivar e incrementar la búsqueda de insecticidas naturales basados en los productos derivados de las plantas como los extractos y los

aceites esenciales que poseen metabolitos secundarios con propiedades insecticidas, demostrando así su utilidad en el sector agrario.

Los extractos de la Familia Meliaceae son estudiados para el uso contra una amplia variedad de insectos (Allan et al. 2002; Schmutterer, 1990). Dentro de las Meliaceas, ***Melia azedarach* L.** contiene compuestos que actúan como repelente, insecticida e inhibidor de la alimentación y crecimiento; motivo por el cual, en el presente trabajo de investigación, se analizó la actividad antialimentaria y efecto tóxico del extracto vegetal de ***Melia azedarach* L.** sobre larvas del tercer estadio de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**. En tal sentido, ***Melia azedarach* L.** sintetiza limonoides triterpenoides (Akhtar et al, 2008) con propiedades antialimentarias y biocidas, y ante la necesidad de contar con nuevas alternativas en el control de insectos plagas y enfermedades en el sector agrícola.

Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación, teniendo como objetivos:

- Desarrollar una nueva metodología de crianza de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** con dieta artificial, en laboratorio.
- Evaluar el efecto antialimentario del extracto vegetal de ***Melia azedarach* L.** sobre el consumo de hojas de maíz utilizando diferentes bioensayos.
- Medir el efecto tóxico de los extractos vegetales de ***Melia azedarach* L.** sobre larvas del tercer estadio de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** según la concentración utilizada.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Cultivo de *Zea mays* L. "maíz" y su importancia

El maíz, *Zea mays* L., es un cultivo originario del continente americano, específicamente de México, Centroamérica y Sudamérica (Llanos, 1994). Es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y debido a sus grandes bondades y multitud de usos se ha convertido en el cultivo más importante entre los cereales a nivel mundial por su producción (795.935.000 de toneladas, en la temporada 2009-2010, superando al trigo y al arroz), de las cuales el 90% corresponden a maíz amarillo y el 10% restante a maíz blanco. Ocupa el segundo lugar en área de siembra, con alrededor de 140.000.000 de has, se siembra en 135 países y se comercializan en el mercado internacional más de 90 millones de toneladas (CIMMYT, 2012). Es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Es previsible que la demanda de maíz como alimento humano y animal crezca en las próximas décadas en los países en desarrollo a una tasa mayor que la del trigo o del arroz (Byerlee & Saad, 1993).

En el Perú, su cultivo está extendido (18 % del área cultivada) y se emplea tanto en dieta humana como en alimentación animal (FAO, 2009). En el año 2009, la producción nacional fue de 1,26 millones de toneladas, la cual se ha incrementado en 2% comparado con el año 2008 que fue de 1,21 millones de toneladas, cabe mencionar que los departamentos que aumentaron su producción fueron Ica, Huánuco, Lambayeque entre otros. En estos últimos ocho años, la producción ha mostrado una tasa de crecimiento de 3% promedio anual, siendo los meses de Febrero a Junio los de mayor producción principalmente en los departamentos de Lambayeque, La Libertad, Lima, San Martín, Ancash, Piura, Cajamarca, y Loreto, que concentran el 83,46% de la producción total. La región de Lambayeque aumentó su rendimiento entre 5 a 15%; en el año 2009, superando las 5 t/ha. (Ministerio de Agricultura, 2012).

2.2. Principales plagas del maíz

El maíz es afectado por un conjunto de especies, tanto animales como vegetales, que son consideradas plagas de mayor o menor importancia, y que pueden diferenciarse a grandes rasgos en: plagas animales (vertebrados, artrópodos, nematodos), malezas (gramíneas, latifoliadas) y enfermedades (bacterias, hongos virus, mico plasmas, etc.) (Guerra, H. y Clavijo, J. 1993).

Dentro del orden Lepidoptera familia Noctuidae, se encuentra el gusano trozador ***Agrotis ipsilon* Hufnagel**, el gusano elotero ***Helicoverpa zea* Boddie** y la plaga principal, el gusano cogollero ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**. También se puede encontrar trips ***Caliotrips phaseoli* Hood** y ***Frankliniella spp.***; pulgón del cogollo ***Rhopalosiphum maidis* Fitch**, la araña roja ***Tetranychus urticae***. Koch, la chicharrita del maíz ***Dalbulus maidis*** (De Long y Wolcott), ***Dalbulus elimatus* Ball**, la gallina ciega ***Phyllophaga sp.***, el gusano de alambre ***Elateridae sp.*** y ***Melanotus sp.*** (SIA-HUARAL 2004).

2.3. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith); Lepidoptera, Noctuidae.

El gusano cogollero del maíz (***Spodoptera frugiperda* Smith**) Lepidoptera: Noctuidae fue descrito por primera vez por J.E. Smith en el año 1852 y se han considerado algunas modificaciones posteriores a su clasificación, finalmente se ubicó dentro del género *Spodoptera*. Dentro de éste se pueden encontrar algunas especies como: ***Spodoptera dolichos* F.**, ***Spodoptera eridiana* Cramer**, ***Spodoptera exigua* Hubner**, ***Spodoptera latifascia* Walker**, ***Spodoptera ornithogalli* Guenee**, ***Spodoptera praefica* Grote**, ***Spodoptera pulchella* Herrich-Schaffer**, ***Spodoptera cosmioides* Walker** y ***Spodoptera frugiperda* Smith**, ocasionando severos daños, y puede provocar pérdidas que van desde un 20 % hasta la pérdida total del cultivo desde las primeras etapas del desarrollo de la planta e incluso cuando este se encuentra en épocas de floración (Del Rincón *et al.*, 2006).

***Spodoptera frugiperda* Smith** ataca a 20 especies de gramíneas, 8 leguminosas y 30 especies de otras familias. Es la principal plaga del follaje tanto en el maíz como en el sorgo, pudiendo causar la muerte de la planta en su primera etapa de desarrollo, la larva puede atacar tanto la mazorca como la panoja. Estudios realizados reportan que esta plaga puede reducir la producción de maíz, hasta en un 60 %. También se ha determinado que cuando se produce un daño foliar del 40 %, se ocasiona una pérdida de hasta 250 kilogramos por hectárea (kg/Ha) de maíz y con el 30 % se disminuye 200 kg/Ha (Gonzales, 2004).

Con respecto a la biología de ***Spodoptera frugiperda* Smith**, los huevos de esta especie son de color blanco amarillento y mide aproximadamente 0.5 milímetro (mm) de diámetro, los huevos son colocados en masas, formadas por capas cubiertas por una secreción y escamas de las hembras (Labrador, 2001). La larva totalmente desarrollada, mide aproximadamente 35 mm de longitud, presentando una coloración bastante variable, existiendo larvas de color verde olivo, y otras gris oscuro a negro, el cuerpo está formado por trece segmentos

con numerosas setas, la cabeza es de color gris oscuro, con una sutura frontal muy visible en forma de Y invertida y un escudo detrás de la cabeza, de color marrón oscuro (Chávez, 2000). Las larvas pasan por 6 ó 7 instares o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los tres primeros. A partir del tercer instar se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se abre o desenvuelve (Ángulo, J. 2000). La pupa es típica de insectos de la familia Noctuidae, del tipo obteta, con 18 mm de longitud, de color marrón caoba, y el tórax y abdomen visibles. Los adultos presentan dimorfismo sexual; el macho tiene cabeza pequeña, ojos prominentes, antenas filiformes y abdomen pubescentes de color ceniza, siendo el tórax más oscuro que el abdomen, las alas anteriores son de color pardo oscuro, presentando una franja conspicua en el borde externo, al compararla con el macho, la hembra presenta cabeza pequeña, ojos conspicuos y tórax y abdomen pubescentes de color ceniza, siendo el tórax de color más oscuro; las alas anteriores son grisáceas y presentan franjas menos conspicuas (Labrador, 2001).

El daño provocado en el cultivo de maíz puede presentarse desde una semana después de la germinación hasta cuando el grano formado, pasa de estado lechoso a seco. En plantas de 4 o más hojas, el gusano cogollero permanece escondido en el cogollo comiendo los tejidos tiernos y formando agujeros de diferentes tamaños y formas. En la etapa de formación de flor causa daño en el grano y también en la flor masculina disminuyendo el contenido del polen. Cuando el gusano esta pequeño raspa las hojas y causa un daño llamado “ventanilla”. A medida que crece come más y se comporta como cortador, tierrero o como elotero. Cuando hay mucha población de gusano cogollero puede actuar como langosta medidora, comiendo las hojas del maíz dejando únicamente la vena central de las hojas. Además de las hojas dañadas, un síntoma típico de la presencia del insecto es la excreta fresca que deja sobre el cogollo de la planta (Trabanino, R. 2001).

Por su importancia *Spodoptera frugiperda* (Smith) es objeto de estudio en numerosos laboratorios por lo cual mantener experimentalmente poblaciones es un aspecto fundamental al momento de realizar investigaciones sobre sus enemigos naturales, pruebas de resistencia con nuevas moléculas insecticidas, así como en el desarrollo de estudios biotecnológicos. Así, el uso de dietas artificiales provee una fuente de alimento fácil de manejar, eliminándose de esta manera el problema de trabajar con la planta huésped o con partes de la misma dejando de lado los riesgos de contaminación con Entomopatógenos que esto supone. Para la cría experimental de *S. frugiperda* se emplean varias dietas artificiales; la mayor parte de estas son elaboradas teniendo como base harinas de poroto, soja, maíz, alfalfa, germen de trigo, entre otros, adicionadas con distintos complejos vitamínico e importantes cantidades de agar (Burton, 1967, 1989; Perkins, 1979; Osorio et al, 1982; Singh, 1985; Burton & Perkins, 1989; Valverde et al, 1995).

2.4. Insecticidas botánicos

Las plantas presentan gran diversidad química como consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano o la predación de insectos y animales (Ducrot, 2005). Algunas plantas proveen fuentes naturales de pesticidas botánicos, que son materiales insecticidas selectivos y biodegradables, características deseadas para los productos químicos necesarios para el manejo de las plagas (Marjie, 1994). Según Dale y Egg, citado por Gomero (2000), en el Perú hay más de 300 especies de plantas inventariadas entre, nativas e importadas, potencialmente útiles contra insectos plagas.

Estos productos naturales o metabolitos secundarios (sustancias de bajo peso molecular) son los componentes finales del metabolismo de las plantas, que son normalmente no esenciales para el proceso metabólico básico de éstas. Entre estos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, esteroides y ácidos grasos, entre otros (Ducrot,

2005). Se les usa en productos farmacéuticos y alimenticios, como colorantes y bioplaguicidas, entre otros, siendo sus características específicas, su baja concentración en tejidos vegetales, distribución restringida dentro del reino botánico y su alta especificidad en cuanto a presencia y actividad biológica (Hoss, 2000).

Las plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nemátodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge & Ahmed, 1988). Especies de plantas como ajo (*Allium sativum*), ají (*Capsicum frutescens*), higuera (*Ricinus communis*), nim (*Azadirachta indica*) y paraíso (*Melia azedarach L.*) son materia prima de varios insecticidas comerciales (Rodríguez & Nieto, 1997). Muchas familias de plantas como las Myrtaceae, Asteraceae y Piperaceae son bien conocidas por tener principios como los terpenoides y grupos de amidas que tienen efecto antialimentario, repelente e insecticida que inhibe el desarrollo y el crecimiento de muchos insectos del orden Lepidóptera (Srivastava *et al.*, 2000). En cuanto a su distribución, los metabolitos secundarios pueden estar presentes en todas las partes de la planta, pero son más frecuentes en los órganos que están en una etapa de intenso desarrollo, como las yemas o los brotes de las ramas, las hojas y las raíces, y a veces en cortezas, tallos y semillas (Valencia, 1995).

En la evaluación de la mortalidad de larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* mediante el extracto etanólico de las semillas de *A. cherimolia* y *A. muricata*. Los mayores porcentajes de mortalidad fueron 100 % a 24 horas de exposición, observándose un mayor efecto tóxico larvario a favor de *A. muricata* sobre *A. cherimolia* en 4,58 % de mortalidad (Bobadilla *et al.*, 2002). Más adelante evaluaron los efectos de la aplicación de molido de hojas de ricino (*Ricinus communis*) mezclados con harina de maíz sobre larvas de la «polilla de las harinas», donde la concentración al 15 % presentó una mortalidad de 100 % (Collavino *et al.*, 2006) Mientras que en la evaluación de la actividad insecticida en ninfas de IV y V estadio de *Rhodnius pallescens*,

Rhodnius prolixus y ***Rhodnius colombiensis***, con extractos hidroalcohólicos de hojas de ***Solanum macranthum***, a diferentes concentraciones, la máxima actividad insecticida se presentó pasadas 24 h y utilizando concentraciones inferiores a 0,3 mg/ml (Hernández *et al.*, 2010). Por otro lado, las especies ***Agave americana*** (maguey), ***Cissampelos grandifolia*** (legía) y ***Hura crepitans*** (catahua) han brindado resultados aceptables en las pruebas de laboratorio, llamando especialmente la atención por estar dotadas de una significativa actividad insecticida que ocasiona una merma en las poblaciones de los fitófagos del algodón, y que supera al extracto acuoso de ***Lonchocarpus nicou*** (barbasco), primigenio en la línea de las especies biocidas (Fuentes *et al.*, 2010).

Tres familias de plantas que llaman la atención como fuentes prometedoras de compuestos insecticidas son: Annonaceae, Solanaceae y Meliaceae. Estas familias han sido seleccionados para ser estudiados por las siguientes razones: 1) poseen los diferentes grupos químicos para el control de insectos, 2) son las familias comunes en los trópicos y se cultivan en varias regiones; 3) hay investigaciones que han mostrado actividad biológica contra los insectos y se destacan como las plantas potenciales para su uso en los trópicos (Orozco *et al.*, 2006). La familia Meliaceae contiene cerca de 1.400 especies (Nakatani, 2001), algunos de los cuales se destacan por tener características insecticidas, debido al hecho de que contienen limonoides triterpenoides (Akhtar *et al.*, 2008). Este grupo de compuestos ha conducido un gran interés debido a su alta actividad sobre el comportamiento y fisiología de varias especies de insectos fitófagos (López *et al.*, 1998). Azadiractina es el compuesto que ha mostrado los mejores resultados, causando la mortalidad, la actividad anti-alimentación y la disuasión en las plagas agrícolas importantes tales como: ***Spodoptera littoralis*** Bois, ***Schistocerca gregaria*** Dallas, ***Spodoptera gregaria*** Forskal, entre otros (Mordue y Nisbet, 2000).

Además de azadiractina, hay otros triterpenoides como salanine, meliantrol y nimbina, considerados como los más importantes, ya que han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de los insectos de plagas de importancia agrícola y tanto la salud humana (Schmutterer, 1990). Esa es la razón por la que se utiliza para la producción de insecticidas comerciales tales como Margosan-O®, Neem Gold®, Neemark®, Azatín®, entre otros (Isman, 2006). Debido a la continua actividad biológica que se muestra azadiractina en un gran número de insectos, la búsqueda de nuevos limonoides con propiedades insecticidas de otros miembros de la familia Meliaceae comenzó. Las plantas como la **Melia azedarach L.** y algunas especies del género *Trichilia* han resaltado (Akhtar et al., 2008). **Melia azedarach L.**, contiene limonoides con propiedades similares a las de *A. indica*, con los siguientes compuestos: Meliantrol, melianol, meliacin, meliacarpin (Nakatani, 2001), azaderachine (Chun et al, 1994) y meliartenin (Carpinella et al, 2002). Meliartenin, que cuenta con un efecto contrario a la alimentación, se destaca entre estos metabolitos analizados en diversos insectos (Carpinella et al, 2002; Gajmer et al, 2002; Valladares et al, 2003; Leite et al, 2006; Coria et al, 2008; Parra- Henao et al, 2007). La actividad anti-alimentación de este compuesto muestra que a dosis de 0,8 a 27,6 g/cm² causar un efecto inhibitor de más de 75 % y un efecto moderado de 50 a 75 % para la mayoría de las especies tratadas (Carpinella et al, 2002; Carpinella et al., 2003).

Los derivados de meliáceas han sido evaluadas en muchos grupos de insectos de importancia agrícola que incluyen insectos masticadores tales como **Spodoptera litura** y **Tuta absoluta** (Juan et al, 2000; Wheeler & Isman, 2001; Goncalves y Vendramim, 2007), insectos chupadores de savia como **Myzus persicae**, **Bemisia tabaci** y **Aphis gossypii** (Fournier & Brodeur, 2000 ; Abou et al, 2001; Khalequzzaman y Nahar, 2008), y almacenados semillas insectos como **Tribolium confusum** y **Sitophilus zeamais** (Del Tío et al, 1996; Silva et al. , 2003). Muchos tipos de disolventes se han utilizado para extraer limonoides, tales como: metanol (Abou et al, 2001), agua (Aliero, 2003; García et al,

2006), acetona (Carrizo et al, 2006), etanol (Coria et al, 2008) y hexano. Los extractos obtenidos a partir de plantas meliáceas se han disuelto principalmente con agua (García et al, 2006).

Otro aspecto importante a destacar, al menos para ***A. indica***, es el hecho de que hay varias investigaciones en las que no ha habido ningún efecto perjudicial grabados sobre fauna benéfica, ya sea en las abejas o los enemigos naturales de las plagas. Por lo tanto, ***A. indica*** puede ser usado como parte de los sistemas de manejo integrado de plagas, debido al impacto negativo nulo en los polinizadores de los cultivos o depredadores de plagas de insectos (Iannacone y Lamas, 2002; Iannacone y Lamas, 2003).

2.4.1. Antecedentes de la actividad de extractos vegetales de *Melia azedarach* L. en el control de insectos

Dentro de la familia Meliaceae, dos especies son investigadas, estas son ***Azadirachta indica* A. Juss** («neem») y ***Melia azedarach* L.** («paraíso»), de las cuales se han aislado metabolitos secundarios del tipo limonoide con efectos negativos sobre insectos y otros artrópodos (Kraus *et al.*, 1987; Schmutterer, 1990; Carpinella *et al.*, 2003); especies de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Isóptera, Phthiraptera y Hemíptera han sido estudiadas para evaluar la actividad de extractos crudos e ingrediente activo de ***M. azedarach*** (Dilawari *et al.*, 1994; Schmutterer, 1995; Valladares *et al.*, 1997, 1999; Brunherotto & Vendramim, 2001; Carpinella *et al.*, 2003, 2007).

Los experimentos con obtención de extractos a partir de distintas estructuras del «paraíso» mostraron acción antialimentaria sobre larvas de ***Spodoptera exigua* (Hübner)** ***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)** ***Spodoptera eridania* (Cramer)** y ***Spodoptera littoralis* (Boisd)**; además de una reducción en la utilización del alimento en larvas de la última especie e ingredientes activos aislados de ***Melia azedarach* L.** también produjeron efectos disuasivos de la

alimentación en ***S. litura*** (Fabricius) (Macleod *et al.*, 1990; Gomero & Hoss, 1994; Del Tío *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Carpinella *et al.*, 2003).

En bioensayos, los extractos de ***Melia azedarach*** L. (paraíso) afectan negativamente la alimentación, el desarrollo y supervivencia de numerosas especies de insectos, se probaron los extractos acuosos de los frutos maduros de hojas amarillas de esta planta contra ***Spodoptera eridania*** encontrando que el extracto eliminó el 100% de las larvas tratadas sin que ninguna de ellas llegara a pupar, se observó que los extractos de fruto y hoja senescente de ***M. azedarach*** afectaron la alimentación de las larvas de ***Spodoptera eridania***, pero los efectos fueron diferentes según la dosis utilizada y el ensayo efectuado (Rossetti, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material botánico

Estuvo constituido por hojas de la planta el Paraíso (*Melia azedarach* L.) procedentes de la recolección manual en los alrededores del campus de la UNPRG.

3.1.2. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por huevos y larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) obtenidas de la crianza artificial realizada en el laboratorio.

3.1.3. Población y muestra de estudio

Se consideró como población a las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) obtenidas de la crianza en laboratorio a partir de las larvas colectadas en maíz cultivado de campos del distrito Reque, provincia de Chiclayo, en la Región Lambayeque. Los bioensayos se realizaron con 160 larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda*

(Smith) como muestra, esta cifra fue calculada según los individuos necesarios para la realización de cada bioensayo.

3.2. Métodos

3.2.1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue aplicado y experimental y para contrastar la hipótesis se utilizó el Diseño en Bloque Completamente al Azar (DBCA).

3.2.2. Lugar de muestreo

Durante abril – junio de 2013 se recolectaron 130 larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** de diferentes estadios en 7 campos comerciales de maíz (quince a veinte larvas por campo) del distrito de Reque de Lambayeque (Figura 1); la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1) se determinó con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque está entre los 20 de la provincia de Chiclayo. Reque tiene una superficie de 47,03 Km² y se ubica entre los paralelos 6°52'00" latitud sur y 79°49'27" longitud oeste, presentando un clima cálido, templado y seco, cuya temperatura oscila entre 19 y 22 °C, llegando hasta los 33 °C en verano (Municipalidad Distrital de Reque, 2013).

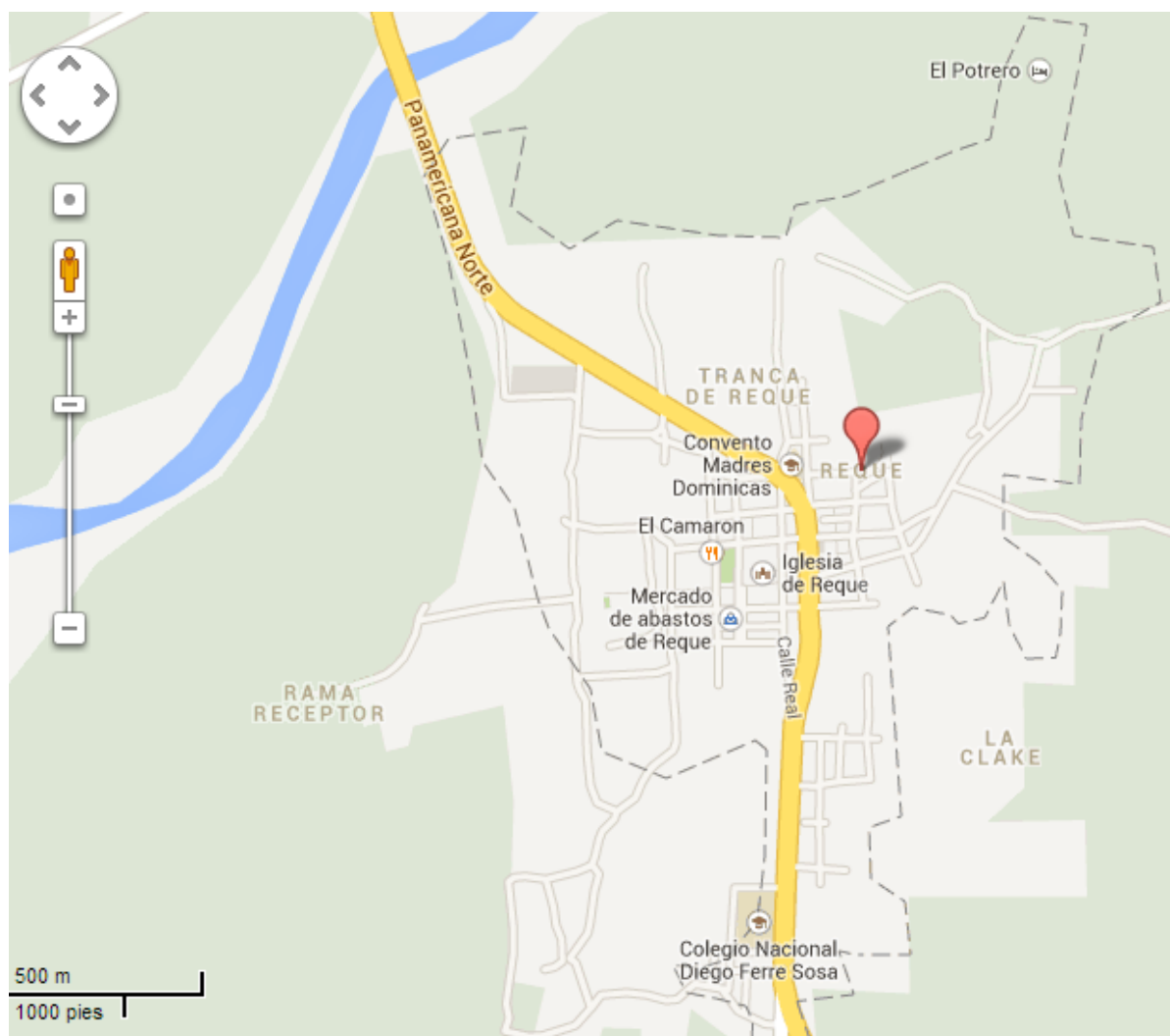


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de muestreo en el distrito de Requena, provincia de Chiclayo, Región Lambayeque. Abril-Junio 2013 (<http://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=ll>).

Tabla 1. Posición de los campos de *Zea mays* L. “maíz” donde se realizó el muestreo de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) abril - junio de 2013

Campo agrícola	Distrito	Punto	Posición (UTM) – 17M		msnm
1	Reque	003	0629717	9240533	23
2	Reque	004	0629553	9240462	25
3	Reque	005	0629098	9240215	24
4	Reque	006	0629153	9239660	25
5	Reque	015	0631753	9241791	88
6	Reque	016	0631825	9241960	46
7	Reque	018	0632014	9242083	44

3.2.3. Colecta en campo y acondicionamiento en laboratorio

Para la crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en laboratorio se empleó la metodología de crianza descrita por Chacón (2009), a la cual se le realizaron algunas modificaciones determinadas en una crianza piloto:

- a) **Colecta en campo:** Se realizaron colectas manuales de larvas en diferentes estadios de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en plantaciones de maíz de Reque, en los campos comerciales de maíz seleccionados se realizó un reconocimiento visual para identificar preliminarmente el “daño fresco”, para lo cual se revisó la última hoja en el cogollo de las plantas de maíz, específicamente sobre aquellas plantas que presentaron en las hojas apicales signos de defoliación, corte y restos de excrementos del gusano plaga (Figura 2). A continuación, se colectaron treinta y cinco larvas por campo. Durante los 35 días que duró el muestreo se recolectaron 213 larvas.
- b) **Acondicionamiento de larvas:** Las larvas colectadas se transfirieron a una microjaula plástica rectangular en la que previamente se colocaron hojas tiernas de maíz que sirvieron de alimento a las larvas colectadas, pudiendo ser transportadas vivas desde el campo hasta el laboratorio (Figura 3).

En los ambientes del Centro de Altos Estudios en Biotecnología-UNPRG, las larvas colectadas fueron identificadas según la morfología dada por Chacón (2009), luego fueron individualizadas y acondicionadas en unidades de crianza que consistieron en envases de plástico de 500 cc a los que se cubrió con gasa para posteriormente asegurar con una liga. Estos frascos funcionaron como microjaulas de desarrollo larval; en ellas se introdujo pedacitos de hojas tiernas de maíz que sirvieron de alimento a las larvas durante su primer estadio larval y que fueron cambiadas todos los días hasta que las larvas



Figura 2. Planta de *Zea mays* L. “maíz” en campos de cultivo de Reque con presencia del gusano plaga.



Figura 3. Las larvas colectadas en microjaula plástica para transporte del campo al laboratorio.

llegaron al segundo estadio y se instalaron en un ambiente de crianza del laboratorio (Figura 4).

c) Acondicionamiento de pupas: Una vez formadas, las pupas fueron sexadas; se les desinfectó con una solución de lejía 0.1% por espacio de 30 segundos (Figura 5), se trasladaron a envases conteniendo algodón humedecido cubiertos con gasa sujetadas con liga, donde se observaron diariamente para controlar su humedad (Figura 6).

d) Manejo de adultos: Una vez que las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) alcanzaron la fase de pupa, se prepararon jaulas cuadradas de apareamiento a partir de estructuras de esquinas de madera y con paredes cubiertas por organza, estas jaulas fueron de 50 cm por lado (Figura 7).

Las paredes del interior de las jaulas se forraron con papel bulky plegado en forma de acordeón con la finalidad de dar comodidad a las mariposas y aumentar el área de oviposición, en el interior de las jaulas se colocaron unas macetas/bolsa para cultivar de 20 cm de diámetro en la base por 25 cm de altura con maíz en fase de crecimiento lento (Figura 8), para favorecer la oviposición de las hembras sobre las hojas de maíz y en la superficie de la tierra de cultivo de las macetas se colocaron las pupas sexadas (Figuras 9 y 10) a punto de eclosionar, aproximadamente en una relación de hembras y machos 6:5. Los adultos fueron alimentados diariamente con una solución de miel de abeja 10% y agua destilada esterilizada, embebida en algodón en pequeños recipientes de plástico, dentro de los ponederos. Una vez culminado su ciclo de vida se extraían para su identificación (Figuras 11).



Figura 4. Unidades de crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en el Centro de Altos Estudios en Biotecnología- Lambayeque.



Figura 5. Desinfección de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) con una solución de lejía.



Figura 6. Pupas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en envases con algodón humedecido para control de humedad.



Figura 7. Jaula de apareamiento *Spodoptera frugiperda* (Smith).



Figura 8. Macetas/bolsa con maíz en el interior de las jaulas de apareamiento.



Figura 9. Identificación y sexaje de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) con el apoyo de un estereoscopio.



Figura 10. Pupas sexadas a punto de eclosionar en macetas dentro de la jaula de apareamiento.



Figura 11. Identificación de adultos de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

3.2.4. Obtención de larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith)

Los huevos se acondicionaron en envases de plástico de 500 cc y sobre su base se colocaron hojas de maíz. Luego se cubrieron con gasa sujeta con ligas y fueron rotulados con la fecha de postura hasta la eclosión de las larvas (Figura 12). Las larvas se alimentaron durante el resto de su desarrollo con la dieta artificial descrita por Murúa (2003) con modificaciones determinadas por la autora en una crianza piloto (Figura 13). La dieta fue envasada y se mantuvo en refrigeración para su posterior utilización durante la crianza artificial cambiando el alimento a las larvas de manera interdiaria (Figura 14).

Las unidades de crianza fueron colocadas en un estante en el Laboratorio de Crianza de Entomopatógenos del Laboratorio de Altos Estudios en Biotecnología de la UNPRG, la crianza se realizó entre Mayo y Agosto de 2013, con una temperatura mínima de 21 °C y una máxima de 30 °C y una humedad relativa de 68 %.

- Determinación del estadio larval de *Spodoptera frugiperda* (Smith) para desarrollo de bioensayos.

Para la determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (Smith) se tomaron los parámetros establecidos por Villa Castorena (2004).

Las larvas se pasaron individualmente a una caja Petri para ser observadas al estereoscopio intercalando días para detectar los cambios de las mudas de las larvas, cuando el desprendimiento de la cutícula ocurría se midió el ancho de la cabeza utilizando un papel milimetrado (Figura 15).



Figura 12. Eclosión de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en unidades de crianza.



Figura 13. Preparación de la dieta artificial de Murúa (2003) para *Spodoptera frugiperda* (Smith) modificada.



Figura 14. Lava de *Spodoptera frugiperda* (Smith) alimentándose de dieta artificial.



Figura 15. Observación al estereoscopio de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

ESTADIO	Rangos del ancho de la cabeza (mm) de las larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) Villa Castorena (2004).
I	0.64
II	>0.64 a 1.14
III	>1.14 a 1.72
IV	>1.72 a 2.38
V-VII	>2.38

Después de la instalación las larvas se distribuyeron en bloques de acuerdo al estadio en que se encontraban. Se utilizaron las larvas en estadio III para la realización de los bioensayos

3.2.5. Obtención de discos foliares para los bioensayos

Con una mezcla de tierra de cultivo y musgo en proporción 1:1 se sembraron semillas de maíz duro amarillo, ***Zea mays* L.** (Poaceae), usando envases de plástico de 10 cm de diámetro en la base por 12 cm de altura como macetas para cultivar; en el invernadero del Centro de Altos Estudios en Biotecnología-UNPRG (Figura 16).

Las plantas de maíz obtenidas se utilizaron para la obtención de los discos foliares necesarios para los bioensayos (Figura 17).



Figura 16. *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, sembrado en el invernadero del Centro de Altos Estudios en Biotecnología de la UNPRG.



Figura 17. Hojas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro para la realización de los bioensayos.

3.2.6. Preparación de extractos vegetales

a) **Acondicionamiento del Material Vegetal para la preparación de los Extractos:** Se realizó la colecta de hojas de *Melia azedarach* L, de plantas establecidas en el campus de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Figura 18).

b) Preparación de los Extractos Acuósos Crudos

Para la preparación de los extractos se empleó el método de maceración modificado descrito por Osuna (2005):

Las hojas de *Melia azedarach* L. fueron lavadas y pesadas. Se utilizaron 150/250/350 gramos de hojas frescas por litro de agua destilada esterilizada. Las hojas se machacaron y se dejaron remojando en agua destilada esterilizada durante 24 horas (Figuras 19 y 20). Estas mezclas se la almacenaron por separado en frascos de vidrio herméticamente cerrados de color oscuro (Figura 21). Pasadas las horas de maceración los extractos acuósos fueron filtrados y se envasaron para luego ser utilizados.

3.2.7. Bioensayos:

Para la evaluación del efecto antialimentario del extracto de *Melia azedarach* sobre el consumo de hojas de maíz por *Spodoptera frugiperda* (Smith)

3.2.7.1. Ensayos de preferencia

Para determinar el efecto antialimentario de los extractos se emplearon pruebas de elección (Rossetti, 2008). Se utilizaron larvas de *S. frugiperda* (Smith) del tercer estadio (L₃) las cuales fueron dejadas sin alimentación durante 4 horas antes del bioensayo.



Figura 18. Colecta de hojas de *Melia azedarach* L. de las plantas establecidas en el campus de la UNPRG.



Figura 19. Lavado de hojas de *Melia azedarach* L.



Figura 20. Machacado de hojas de *Melia azedarach* L.



Figura 21. Maceración de hojas de *Melia azedarach* L. machacadas por 24 horas en frascos ámbar.

Luego se colocaron individualmente dentro de cajas de Petri con fondo de agar al 2% (adaptado de Zegarra, 2010). Se colocó una larva por placa de Petri con dos semicírculos de hoja de maíz (2,5 cm de radio), uno rociado (ambas caras) con 0,25 ml de extracto (150, 250, 350 g/l) y otro con igual cantidad de solvente (agua destilada) (Valladares et al., 1997) (Figura 22).

Los semicírculos con los extractos a estudiar fueron los discos tratados = **T**, y los restantes con igual cantidad de solvente (agua destilada) fueron los discos control = **C**, finalmente se sellaron las cajas con parafilm (Figura 23).

Así, los tratamientos en los ENSAYOS DE PREFERENCIA estuvieron constituidos por un testigo (agua destilada esterilizada) y los extractos de *Melia azedarach L.* en tres dosis diferentes:

$T_1 = 150 \text{ g/l}$

$T_2 = 250 \text{ g/l}$

$T_3 = 350 \text{ g/l}$

Se realizaron 25 repeticiones por concentración del extracto. Luego de 24 horas, se estableció el porcentaje de área consumida (estimando visualmente mediante el uso de papel milimetrado) y se calculó el **índice de inhibición alimentaria (IIA)** se calculó mediante la ecuación (Hassanali & Bentley, 1987):

$$(IIA\%) = \left[\left(1 - \frac{T}{C} \right) \times 100 \right]$$

Siendo:

T = consumo promedio de discos foliares tratados con extracto.

C = consumo promedio de discos foliares en los controles.



Figura 22. Pruebas de elección para determinar el efecto antialimentario de los extractos de *Melia azedarach* L.

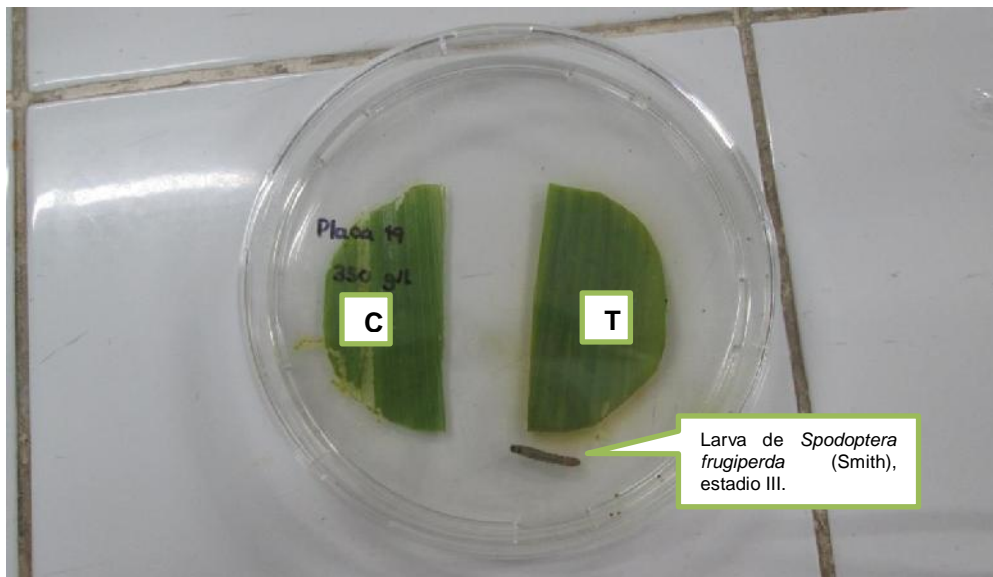


Figura 23. Semicírculos control y tratamiento en cajas Petri con larva de *Spodoptera frugiperda* (Smith) para ensayos de preferencia.

Bioensayos para la evaluación del efecto antialimentario y tóxico del extracto de *Melia azedarach* L. sobre larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith)

3.2.7.2. Ensayos sin posibilidad de elección

Para estudiar los efectos antialimentarios y tóxicos de los extractos, se alimentaron las larvas con círculos de maíz (5 cm diámetro) rociados con 0,6 ml de cada concentración de extracto (placas tratamiento = T) o con agua como control (placas testigo= C) (Figura 24).

Los discos de maíz fueron renovados cada 24 horas, registrándose la mortalidad larval, el porcentaje de alimento consumido (estimación visual) y también el peso de las larvas, del alimento entregado y de las excretas (Figuras 25 y 26).

Así, los tratamientos en los ENSAYOS SIN POSIBILIDAD DE ELECCIÓN estuvieron constituidos por un testigo (agua), los extractos de *Melia azedarach* L. en tres dosis diferentes y un testigo químico (Larvin):

T₀= Testigo

T₁= 150 g/l

T₂= 250 g/l

T₃= 350 g/l

T₄= Larvin (THICARB) Formulación: 375 g/l

Se colocó 1 larva por placa de Petri y se realizaron 15 repeticiones para cada concentración y tipo de extracto.

Además, 10 larvas fueron totalmente privadas de alimento para establecer la mortalidad por ayuno (Figura 27).



Figura 24. Ensayos sin posibilidad de elección



Figura 25. Peso de la hoja de maíz previo a la realización de los bioensayos para ensayos nutricionales.

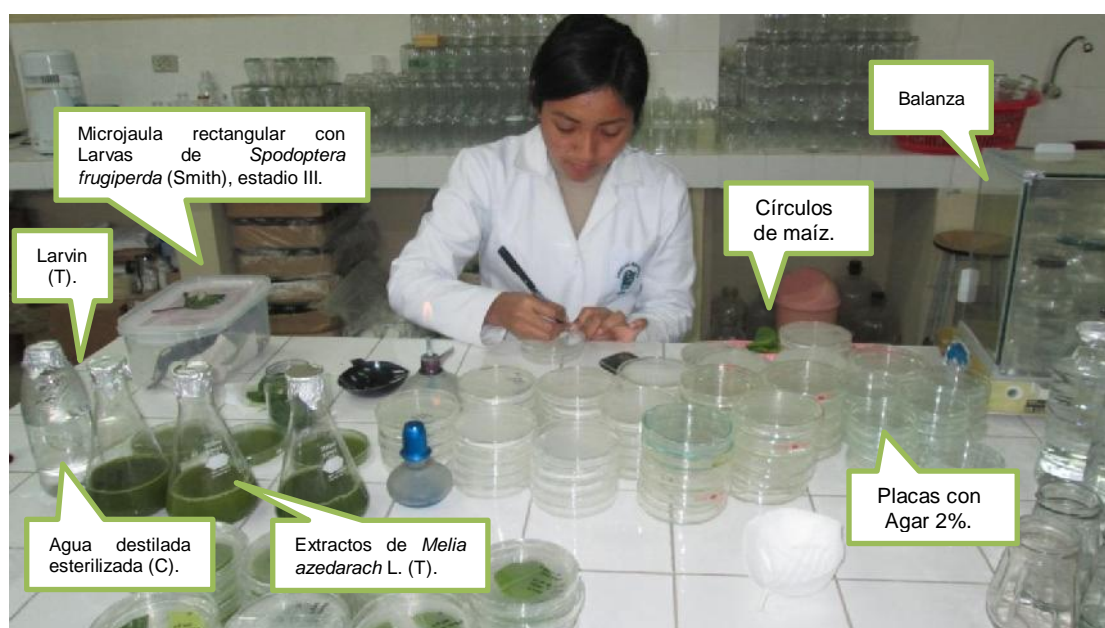


Figura 26. Bioensayos para la evaluación del efecto antialimentario y tóxico del extracto de *Melia azedarach* L.

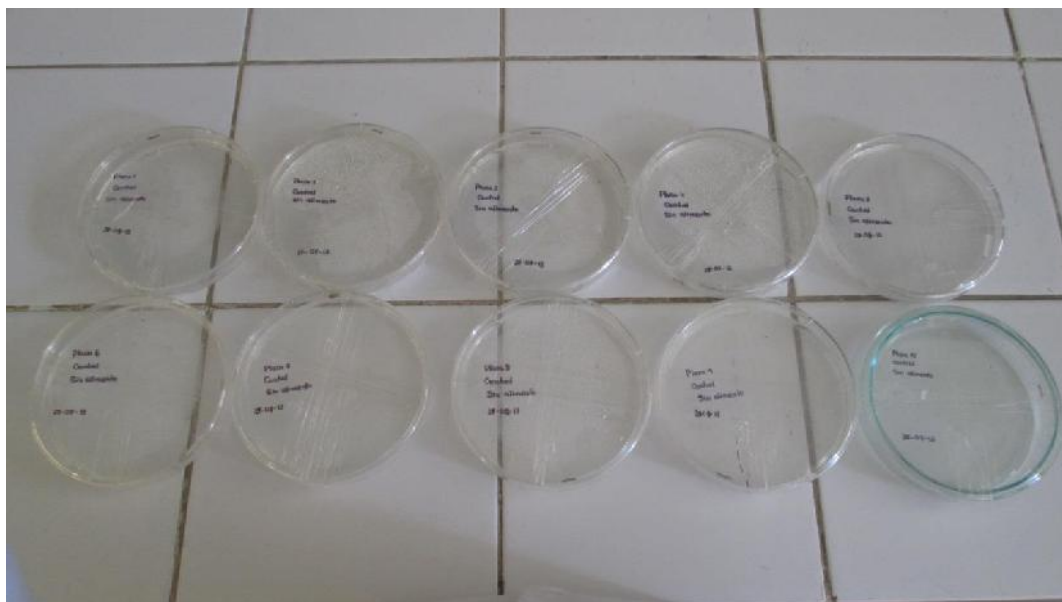


Figura 27. Larvas privadas de alimento.

3.2.7.3. Ensayos nutricionales

Con los datos obtenidos en los ENSAYOS SIN POSIBILIDAD DE ELECCIÓN se calcularon los siguientes índices nutricionales (Fagoonee, 1984):

- *Tasa relativa de crecimiento*

$$(\text{TRCr}) = \frac{(P_F - P_I)}{(P_G \times T)}$$

Dónde:

P_F = peso final de las larvas (mg)

P_I = peso de las larvas al inicio del experimento

P_G = media geométrica del peso larval calculada como: $\sqrt{(P_I \times P_F)}$

T = período de tiempo

- *Tasa relativa de consumo*

$$(\text{TRCo}) = \frac{I}{(P_G \times T)}$$

Dónde:

I = alimento ingerido (mg) calculado como:

$$\frac{\text{peso inicial de la hoja (mg)} \times \text{porcentaje ingerido (estimado visualmente)}}{100}$$

- Eficiencia de conversión del alimento ingerido

$$(\text{ECI}) = \frac{(P_F - P_I)}{I} \times 100$$

- Eficiencia de conversión del alimento digerido

$$(\text{ECD}) = \frac{(P_F - P_I)}{(I - H)} \times 100$$

Dónde:

H = peso de las heces (mg).

- Digestibilidad aproximada

$$(\text{DA}) = \frac{(I - H)}{I} \times 100$$

IV. RESULTADOS

Los resultados se presentan según los objetivos planteados en la presente investigación:

4.1. Nueva metodología de crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) con dieta artificial en condiciones de laboratorio.

Se definió una nueva metodología de crianza para ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** con dieta artificial en condiciones de laboratorio basada en los trabajos previos de Gutiérrez (2002), Murúa (2003), Villa Castorena (2004) y Chacón (2009).

Se estableció un pie de cría de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** con 213 larvas recolectadas en los cultivos de maíz de Reque, se observó una mortalidad larvaria natural por causas no identificadas de 15 larvas y 19 pupas, registrándose así una mortalidad natural total de 16%.

Los 179 individuos de la primera generación se desarrollaron hasta adultos, con los cuales se inició la segunda generación. En la segunda generación, con la modificación de la dieta artificial (Murúa, 2013) se redujo la mortalidad a un 14,5% (21 larvas). Y en la tercera generación el

porcentaje de mortalidad bajó a un 3,2% (7 larvas), tal como se puede observar en la Figura 28. De las 7 larvas muertas, cinco resultaron negruzcas (Figura 29) y necrosadas y dos de ellas fueron infectadas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Figura 30).

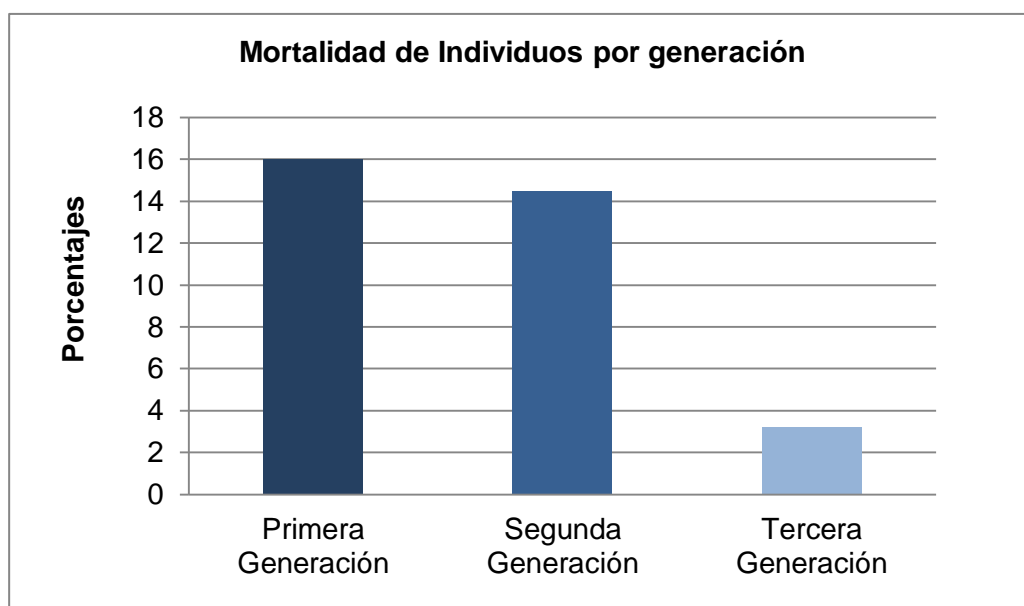


Figura 28. Porcentaje de mortalidad de los ejemplares de *Spodoptera frugiperda* criados en el Centro de Altos Estudios en Biotecnología.



Figura 29. Larva de *Spodoptera frugiperda* (Smith) necrosada.



Figura 30. Larva de *Spodoptera frugiperda* (Smith) atacada por el hongo entomopatígeno *Beauveria bassiana*.

Para optimizar la crianza masiva de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, se modificó la dieta artificial descrita por Murúa (2003), tal como se presenta en la tabla 2. Estas modificaciones se realizaron debido a que la primera vez que se preparó esta dieta, se utilizó levadura de cerveza en polvo, una menor cantidad de agente gelificante y el grano de arroz entero; sin embargo, la consistencia no era lo suficientemente firme para la construcción de galerías por la larva y al contrario, producía exceso de humedad en las unidades de crianza, lo cual favorecía la aparición de hongos que disminuían la probabilidad de supervivencia de las larvas. Para resolver este problema, se optó por la utilización de levadura de cerveza granulada y la modificación de la cantidad de agente gelificante (30 g); además, del aumento de ácido ascórbico (30 g). Estos cambios mejoraron las condiciones de la dieta, al mantener un alto contenido de agua en la mezcla nutritiva semisólida en donde los insectos se alojaban y alimentaban, además de evitar el colapso de las galerías que creaba ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Con estas modificaciones y debido a la firmeza que presentó la dieta, se observó el mejor crecimiento de las larvas, que les permitió completar su ciclo de vida y dejar una mayor descendencia fértil.

Tabla 2. Composición de la dieta artificial utilizada para la cría de *Spodoptera frugiperda* (modificada de Murúa, 2003).

	Descripción	Cantidad
Sólidos	Arroz molido*	800 g
	Fécula de maíz	80 g
	Germen de trigo	140 g
	Levadura de cerveza granulada*	120 g
	Agar-agar	30 g*
Vitaminas y conservantes	Ácido ascórbico	30 g*
	Nipagín	2,7 g
	Ácido sórbico	5,3 g
Líquidos	Formaldehido 40%	7 ml
	Agua destilada	2,5 l*

(*): Modificación en los tipos de ingredientes y cantidades utilizadas para elaborar aproximadamente 1 kg de dieta artificial.

La temperatura promedio del laboratorio de del Centro de Altos Estudios en Biotecnología, donde se desarrolló la crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) fue 24°C. Asimismo, se presenta la tabla 3, donde se observa la duración en días para cada uno de los estados de desarrollo del ciclo biológico de esta especie.

Tabla 3. Duración de cada estado de desarrollo de *Spodoptera frugiperda* (Smith) a 24°C.

Estados de desarrollo <i>Spodoptera frugiperda</i>	Duración en días
Huevo	3-5
Larva	22-25
Pupa	9-12
Adulto	10-13

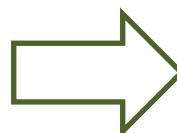
4.2. Evaluación del efecto antialimentario de los extractos vegetales de *Melia azedarach* L. sobre el consumo de hojas de maíz utilizando bioensayos de preferencia.

Los resultados de la evaluación del efecto antialimentario de los extractos vegetales de *Melia azedarach* L. sobre el consumo de hojas de maíz utilizando bioensayos de preferencia se presentan en la tabla 4. Los Índices de Inhibición Antialimentaria (IIA%) se obtuvieron, de acuerdo al porcentaje de consumo de las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) y permitieron calcular el porcentaje de inhibición de ingesta en cada concentración (Figura 31).

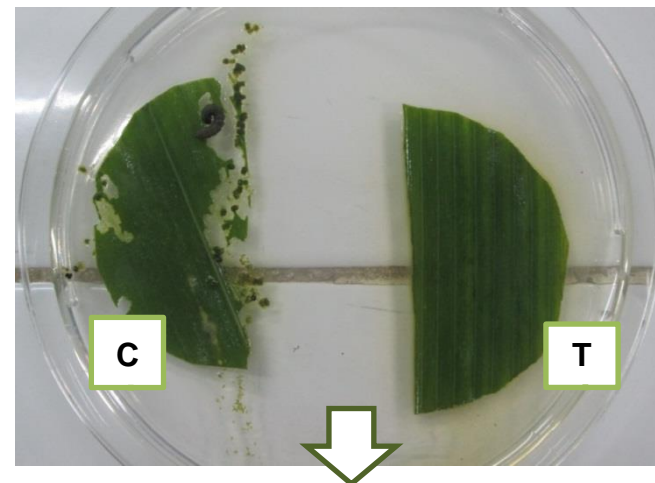
Los extractos de *Melia azedarach* L. mostraron actividad disuasiva de la alimentación sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Tabla 5). Donde se observa que el consumo de hojas tratadas con las diferentes concentraciones de extracto fue significativamente menor respecto a las placas control, registrándose para las concentraciones más altas (250 g/l y 350 g/l) valores de IIA% superiores al 50%. En las pruebas en las que se utilizó extracto de hoja en la concentración 150 g/l (T₁) sólo se observó una reducción del consumo del 33,8%.



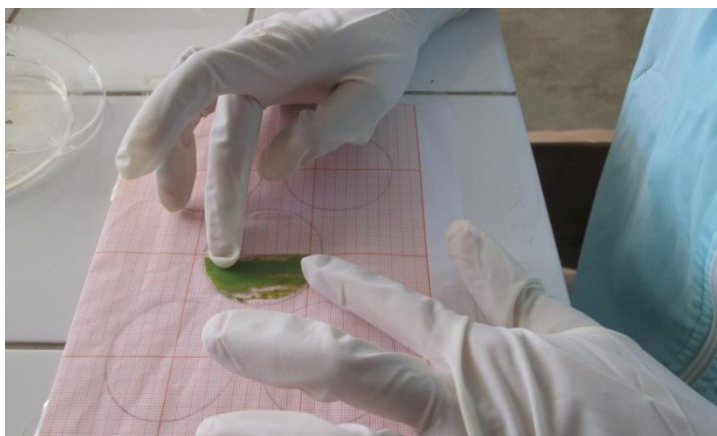
Placas Petri de Ensayos de Preferencia tras 24 horas.



C= Control
T= Tratamiento



Consumo de área foliar por larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en Ensayos de Preferencia.



Estimación visual del área foliar consumida con ayuda de papel milimetrado.

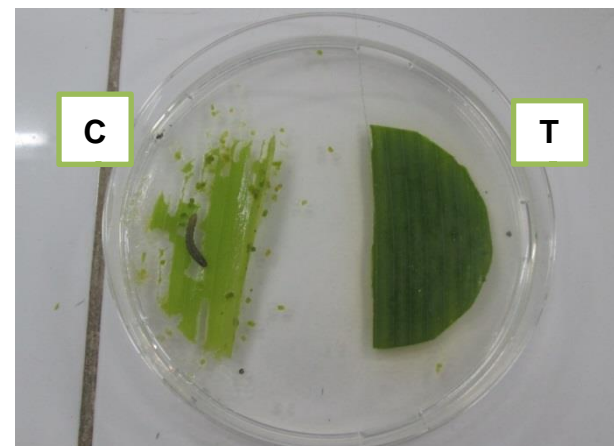


Figura 31. Ensayos de Preferencia para la evaluación del efecto antialimentario.

Tabla 4. Porcentaje (%) de consumo foliar de los semicírculos de maíz por larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) durante los Ensayos de Preferencia en tres diferentes concentraciones (24 horas).

PLACA	T ₁ : 150 g/l		T ₂ : 250 g/l		T ₃ : 350 g/l	
	%C	%T	%C	%T	%C	%T
1	4,9	0,9	97,4	2	13,8	3,9
2	32,5	2,7	45,2	7,8	75	21
3	2,7	1,3	45	3,2	0,6	14,2
4	4	2,3	3,2	1,5	17,5	1,3
5	7,5	41,3	35,9	8,7	47,8	15
6	16	8,9	55	1	53,8	26,2
7	0,4	2,3	62,5	2,9	77,1	42,2
8	11,5	0,3	60	12,5	13,5	15,7
9	4	10,9	97,5	10,2	28,7	2
10	20,9	11,1	19,3	5,7	30,2	12,5
11	4	1,6	75,2	2,3	10,5	2,7
12	17,5	2,4	34,6	0,9	8,6	0,5
13	18,1	1,2	72	22,5	5,4	1,3
14	5,5	7	3,4	1,3	30,2	12,5
15	15	3,3	47,5	5,4	2,4	1,1
16	40	7	37,7	2,6	5,4	2,1
17	0,3	5,6	89,6	0,8	8,1	1,8
18	0,11	0,1	27,5	0,5	30	3,7
19	2,5	13,3	16,2	2,1	6,8	0,3
20	26,5	2,3	79,4	1,6	21,8	2,3
21	4	2,3	35,9	5,7	47,8	15
22	7,5	41,3	55	1,5	53,8	26,2
23	16	8,9	62,5	2,9	77,1	42,2
24	0,4	2,3	84,9	2,5	13,5	15,7
25	11,5	0,3	97,5	10,2	28,7	2

C: Porcentaje (%) de consumo foliar de los semicírculos de maíz tratados con agua destilada esterilizada.

T: Porcentaje (%) de consumo foliar de los semicírculos de maíz tratados con las concentraciones de extracto de *Melia azedarach*

Tabla 5. Índices de Inhibición Antialimentaria (IIA%) obtenidos en los Ensayos de Preferencia empleando diferentes concentraciones de extracto de hojas de *Melia azedarach L.* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith). Promedios (\pm error estándar) de 25 réplicas por concentración.

Concentración	Tratamiento	Control	p ^b	IIA (%) ^a
T ₁ : 150 g/l	2,4	7,5	0,100	33,8
T ₂ : 250 g/l	2,6	55,0	<0,0001	91,2
T ₃ : 350 g/l	3,9	21,8	<0,0001	60,0

^a IIA(%): Índice de inhibición alimentaria = $[(1-T / C) \times 100]$ siendo «T» el consumo promedio de alimento tratado con los extractos y «C» el consumo promedio de alimento en los controles.

^b Consumo significativamente menor en sustrato tratado con extracto ($p < 0.05$), Wilcoxon de comparación por pares.

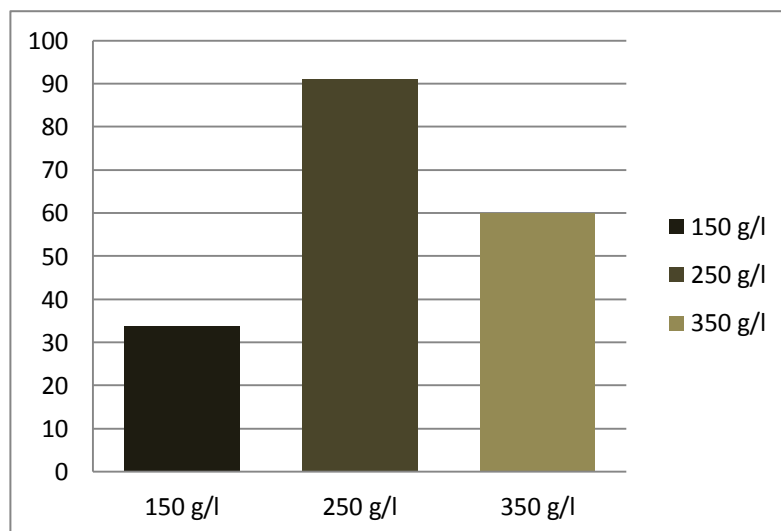


Figura 32. Valores de los Índices de Inhibición Antialimentaria (IIA%) obtenidos en los Ensayos de Preferencia empleando tres diferentes concentraciones de extracto de hojas de *Melia azedarach L.* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith).

En la figura 32 se observa que las concentraciones de mayor actividad antialimentaria fueron T_2 (250 g/l) y T_3 (350 g/l), ya que en las dos se registró una diferencia significativa frente al consumo del control.

4.3. Medición del efecto tóxico de los extractos vegetales de *Melia azedarach* L. sobre larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) utilizando ensayos sin posibilidad de elección.

Los resultados de la medición del efecto toxico de los extractos vegetales de *Melia azedarach* L. sobre larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) utilizando ensayos sin posibilidad de elección se presentan de acuerdo a los siguientes parámetros evaluados:

4.3.1. Evaluación del consumo diario (en % de área foliar) por las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) durante los 25 días de duración de los ensayos:

La evaluación del porcentaje diario de consumo por las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) durante los 25 días que duraron los ensayos se presentan en la Figura 33. En esta figura, se observa que la cantidad de alimento ingerido por las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) difirió según las concentraciones del extracto de *Melia azedarach* L.

A partir del segundo día de experimentación, los extractos en sus tres concentraciones redujeron la ingesta de las larvas en relación a lo observado en los controles, en los que solo se utilizó agua destilada (T_0); sin embargo, la reducción más significativa se observó con los tratamientos T_2 (250g/l) y T_3 (350g/l). Las larvas de los tratamientos T_2 y T_3 ingirieron cantidades de alimento similares a las larvas del tratamiento Larvin (T_4), registrándose en estos dos últimos tratamientos porcentajes de consumo significativamente menores con respecto al tratamiento T_1 (150 g/l) a partir del cuarto y segundo día respectivamente.

A lo largo del estudio (Figura 33) también se observó que los porcentajes de alimento consumido mostraron una relación negativa con relación a la concentración del extracto, alcanzando los siguientes valores mínimos y máximos de consumo (%), en el siguiente orden: T₀ (testigo: agua destilada) 69,9% (día 2) y 88,9% (día 16); T₁ (150g/l) 36,4% (día 3) y 55,7% (día 12); T₂ (250g/l) 11,5% (día 11) y 17,3% (día 3); T₃ (350g/l) 5,3% (día 6) y 10,4% (día 3) y para Larvin (375g/l) 12,6% (día 3) y 16,6% (día 4).

Asimismo, el consumo promedio acumulado (% de área foliar) por las larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** alimentadas con diferentes concentraciones de extracto hojas de ***Melia azedarach* L.** y Larvin en los 25 días de duración de los Ensayos se presentan en la Figura 34, donde se observan las diferencias significativas en los tratamientos T₂ (250g/l) y T₃ (350g/l) con respecto al control, habiendo disminuido el consumo foliar en el tratamiento T₂ en un 67,6% y en T₃ en un 74,5%; mientras que en el tratamiento Larvin (T₄) el porcentaje de consumo promedio acumulado solo disminuyó en un 66.8% con respecto al testigo T₀. Por otro lado, las larvas de T₁ (150g/l) que consumieron el alimento roceado con la menor concentración del extracto no registraron diferencias significativas con respecto al control.

Las larvas control y las que se alimentaron con extracto en concentración 150g/l (T₁) puparon y emergieron el 100% de los adultos al día 25 y 17 respectivamente. En T₂ con una concentración de extracto de hojas de 250g/l, puparon el 7,5% de las larvas pero no se obtuvieron adultos, mientras que en los tratamientos T₃ y Larvin la mortalidad al 100% se observó al sétimo y quinto día correspondientemente.

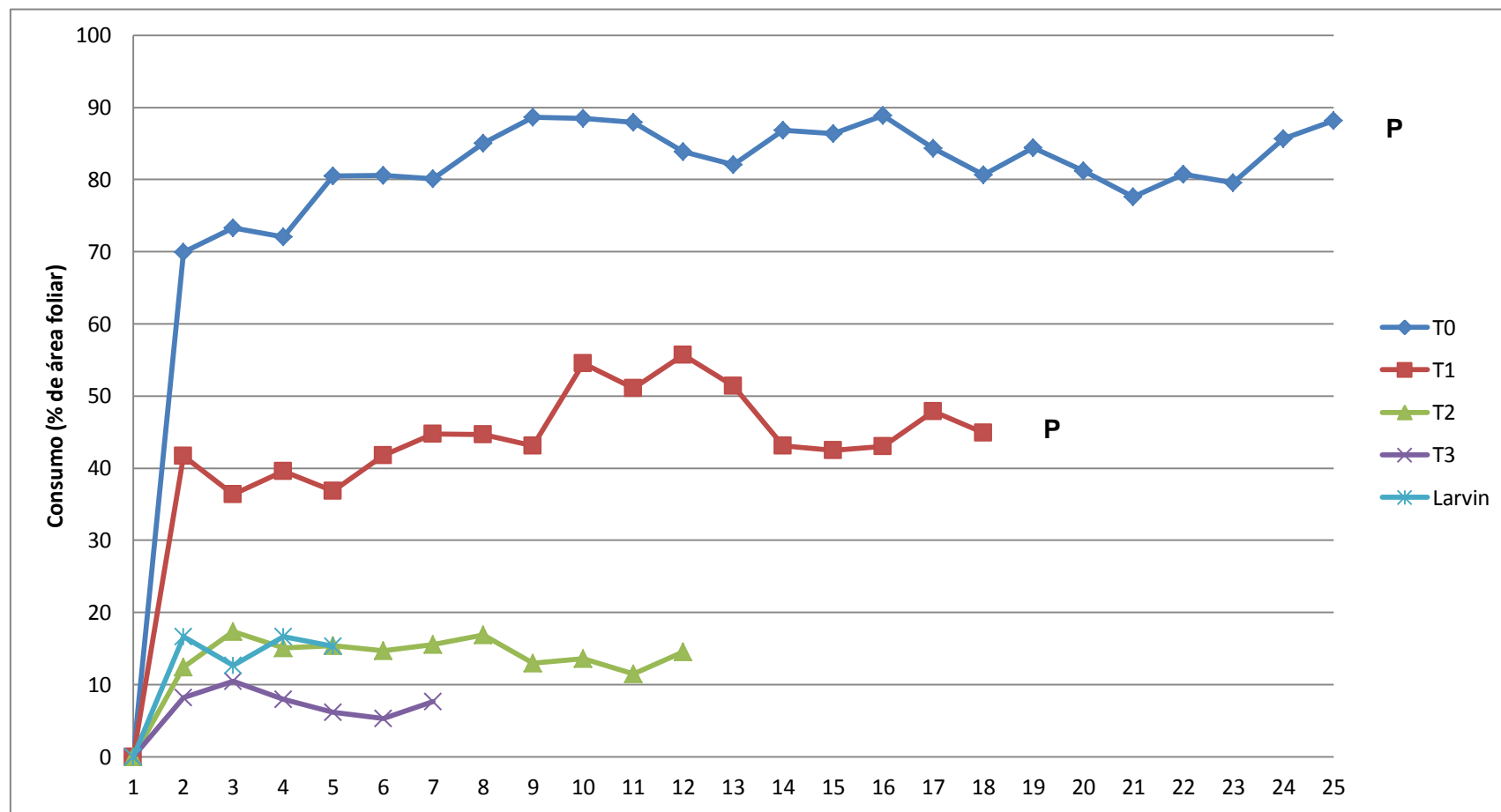


Figura 33. Consumo diario (en % de área foliar) por las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) alimentadas con diferentes concentraciones de extracto hojas de *Melia azedarach* y Larvin durante los 25 días de duración de los ensayos. **P:** Día en que las larvas comenzaron a pupar.

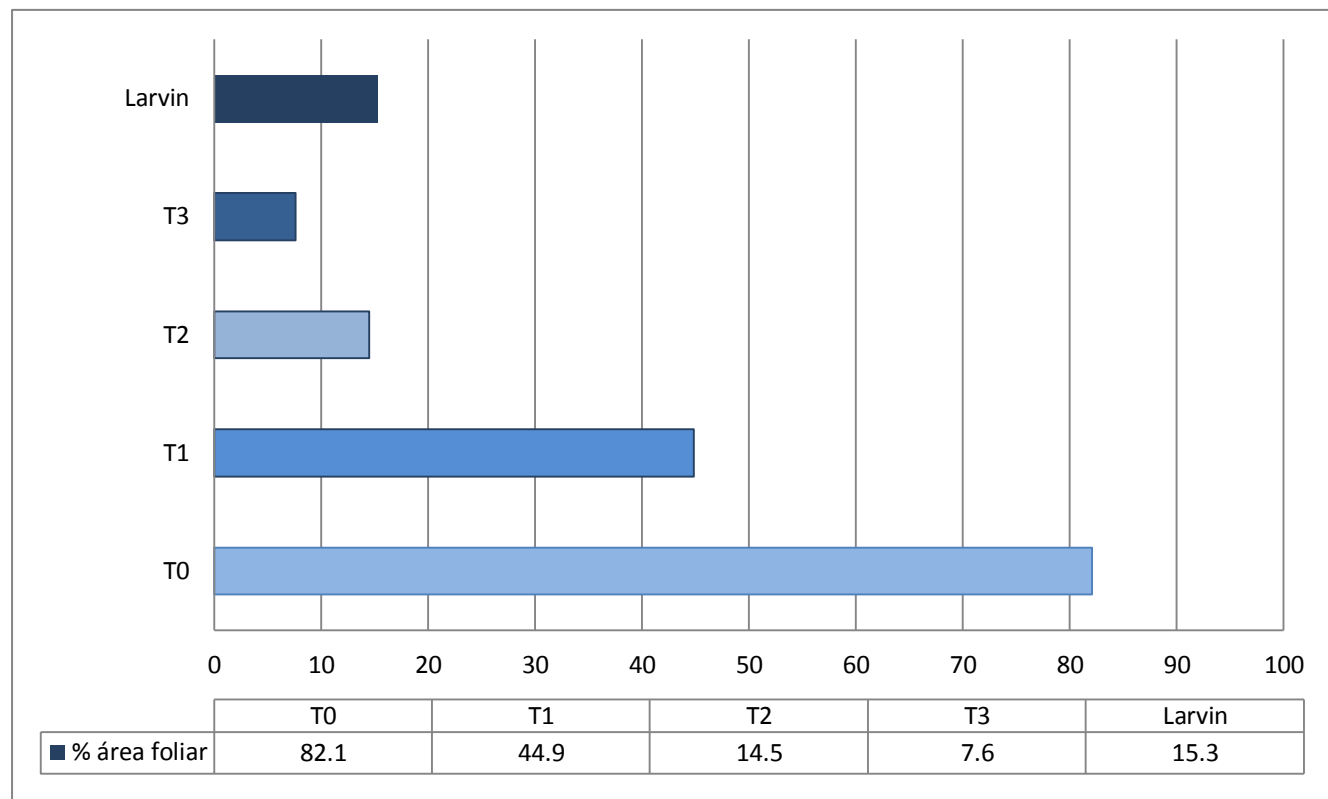


Figura 34. Consumo promedio acumulado (% de área foliar) de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) alimentadas con diferentes concentraciones de extracto hojas de *Melia azedarach* L. y Larvin durante los 25 días de duración de los Ensayos.

4.3.2. Evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas durante los 25 días de duración de los ensayos:

Los porcentajes de la mortalidad acumulada de las larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** durante los 25 días de duración de los ensayos se presentan en la Figura 35.

Se registraron diferencias con todas las concentraciones del extracto de ***Melia azedarach* L.**; sin embargo, las diferencias más significativas se observaron en la mortalidad producida por los tratamientos T₃ y Larvin, quienes causaron la mortalidad total al quinto día.

Las concentraciones T₁ y T₂ ocasionaron porcentajes de mortalidad que difirieron significativamente del control ($< 0,001$), a partir del día 9 y 15 respectivamente; asimismo, ninguna larva sobrevivió después del día 17 para los extractos de ***Melia azedarach* L.** y Larvin. Las larvas en el T₁ (150g/l) alcanzaron el 100% de mortalidad el día 17, mientras que para T₂ (350g/L) ocurrió el día 14.

Las larvas privadas de alimento alcanzaron el 100% de mortalidad al quinto día de comenzados los ensayos, superando mínimamente la mortalidad acumulada con respecto T₃ (350g/l) y Larvin.

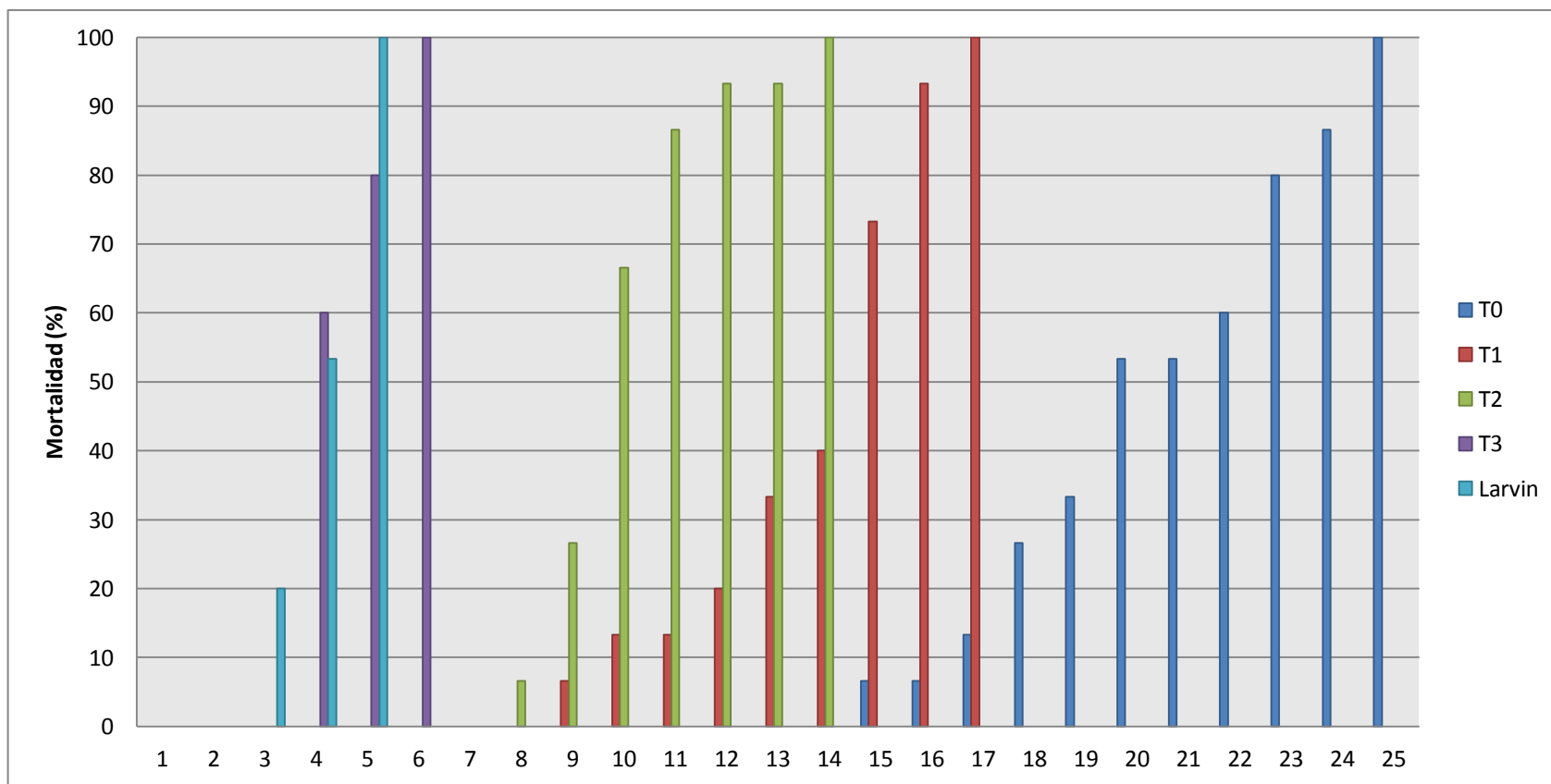


Figura 35. Mortalidad acumulada (porcentaje) de larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con diferentes concentraciones de extracto de hojas de *Melia azedarach* L. y Larvin durante los 25 días de duración del bioensayos.

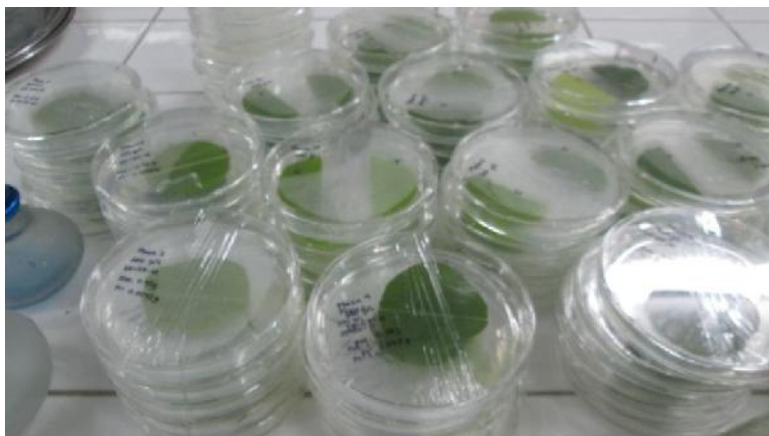
4.3.3. Evaluación de los índices nutricionales obtenidos durante los 25 días de duración de los ensayos:

Los datos tomados durante los ensayos sin posibilidad de elección sirvieron para obtener los resultados de los índices nutricionales a través las formulas descritas en la metodología (Fagoonee, 1984). En la Tabla 6 se presentan estos resultados, donde se observan los índices nutricionales en tasas y porcentajes.

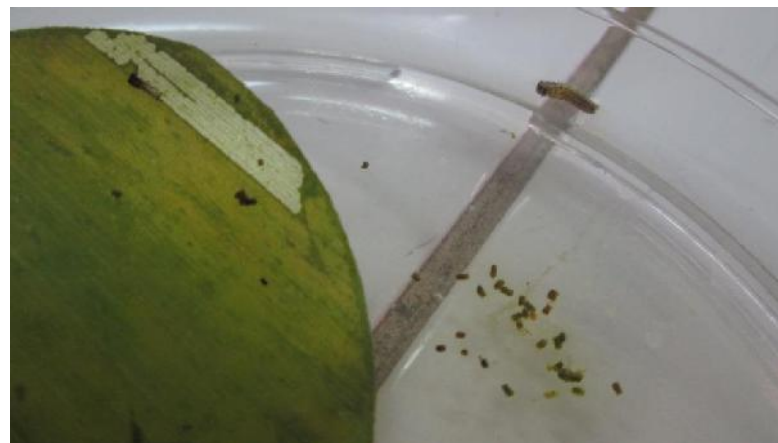
La tasa relativa de crecimiento (TRCr) fue superior en el tratamiento control con respecto a las registradas para todas las concentraciones de los extractos de *Melia azedarach L.* y Larvin; pero solo significativamente superior a T₂ (0,14), T₃ (0,11) y Larvin (0,04).

Con respecto a las tasas relativas de consumo (TRCo), estas fueron significativamente inferiores solo en los tratamientos T₁ (0,12) y T₂ (0,11) con respecto al control (12,11) mientras que con el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas.

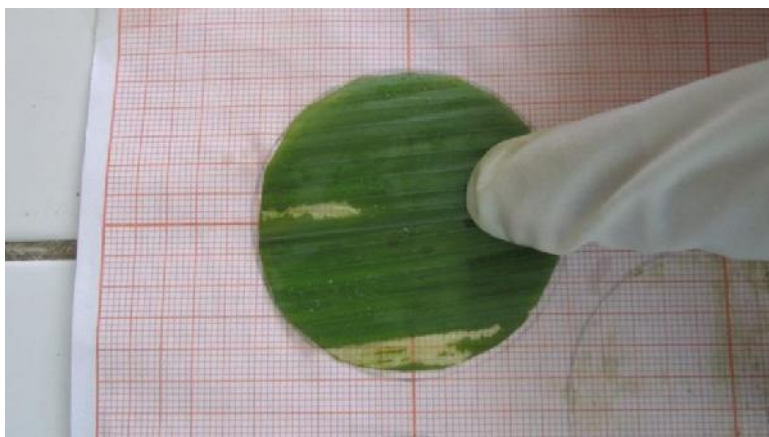
Por otro lado, la eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) se vio afectada significativamente cuando se utilizó el extracto T₂ (1.39); sin embargo, con respecto a la eficiencia de conversión del alimento digerido (ECD) la diferencia más significativa se registró con T₃ (1.68), porcentaje muy distante al obtenido en el control (10.84). En la digestibilidad aproximada (DA) no se observan diferencias significativas, aunque los porcentajes fueron ligeramente superiores en los tratamientos con las concentraciones de extractos más altas y con el tratamiento Larvin.



Bioensayos sin posibilidad de elección.



Larva muerta, consumo foliar y excretas en placa de ensayos sin posibilidad de elección.



Estimación visual del área foliar consumida (%) en ensayos sin posibilidad de elección.



Larva muerta extraída para registrar su peso.

Figura 36. Datos tomados en Ensayos de Preferencia para la evaluación de los índices nutricionales.

Tabla 6. Índices nutricionales (en tasas y porcentajes) obtenidos durante los 25 días de duración de los ensayos. Cada valor corresponde al promedio de 15 réplicas (\pm error estándar).

Tratamiento	Concentración	TRCr* (mg/mg/d)	TRCo* (mg/mg/d)	ECI* %	ECD* %	DA* %
T ₀ : Agua destilada	-	1,64 ^a	12,11 ^a	8,04 ^a	10,84 ^a	76,56 ^a
T ₁ : <i>Melia azedarach</i>	150 g/l	0,58 ^a	0,12 ^b	4,45 ^b	5,58 ^{ab}	81,93 ^a
T ₂ : <i>Melia azedarach</i>	250 g/l	0,14 ^b	0,11 ^b	1,39 ^c	9,01 ^a	86,29 ^a
T ₃ : <i>Melia azedarach</i>	350 g/l	0,11 ^b	3,04 ^c	4,21 ^b	1,68 ^b	65,74 ^a
T ₄ : Larvin	375 g/l	0,04 ^b	1,60 ^{bc}	3,47 ^b	7,42 ^{ab}	94,30 ^a

* **TRCr**: Tasa relativa de crecimiento, **TRCo**: Tasa relativa de consumo, **ECI**: Eficiencia de conversión del alimento ingerido, **ECD**: Eficiencia de conversión del alimento digerido, **DA**: Digestibilidad aproximada.

**Medias seguidas por la misma letra, dentro de cada columna, indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$, Test de Tukey).

V. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados expuestos anteriormente se aprecia que durante el desarrollo de esta nueva metodología de crianza de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** se logró disminuir la mortalidad cambiando algunos ingredientes de la dieta artificial establecida por Murúa (2003) logrando una crianza con mejores resultados.

La mortalidad por causas naturales durante el desarrollo de la investigación, disminuyó tras la incorporación de la dieta artificial a la crianza, conforme pasaban las generaciones de 16 % a 14,5 % y en la tercera generación 3,2 % (Figura 28), reportándose una mortalidad menor que la registrada en trabajos previos donde el menor porcentaje de mortalidad fue 21,11 % (Chacón, 2009) y 15% (Montes, 2008). La mortalidad en nuestra investigación disminuyó ante la mejora de la dieta artificial y los procesos de crianza, en las siguientes generaciones se identificó a *Beauveria bassiana*, una especie con conocida actividad biocontroladora que suele presentarse durante la crianza artificial del cogollero, proveniente en su mayoría de los mismos campos de cultivo donde fueron colectadas, como se determinó en estudios previos (Herrera, 2005; Chacón, 2009).

La dieta artificial se incorporó para fomentar la cría masiva del cogollero dado que el uso de hojas de maíz como alimento durante los dos primeros estadios en cada generación favoreció un alto porcentaje de mortalidad de las larvas recién eclosionadas, debido a que las hojas de maíz se deshidrataban fácilmente y se dificultaba su ingesta por parte de los insectos; por tal razón, las hojas tenían que ser cambiadas a diario disminuyendo la facilidad del método de crianza (Montes, 2008). Es así, que en la dieta artificial de Murúa (2003), rica en carbohidratos y nutricionalmente superior a la crianza basada en hojas de maíz, se mantuvo la cantidad recomendada de formaldehído y ácido sórbico como preservantes y se le adicionó un mayor porcentaje de ácido ascórbico (Tabla 2), dado que la vitamina C es esencial para muchos fitófagos, pues actúa como estimulante alimenticio, en la esclerotización de la cutícula, en otras reacciones defensivas como antioxidante (Carrillo, 1980; Cohen, 2004). La modificación en el peso de agar agar como agente gelificante evito que los componentes más densos precipiten o que los menos densos floten, manteniendo así las condiciones adecuadas para prevenir las reacciones que pueden darse entre los ingredientes y algunos gelificantes como proteínas, pectinas y otros carbohidratos, que son nutrientes utilizados por muchos investigadores en las crianzas artificiales de insectos (Mihm, 1984; Chaudhury & Álvarez, 1999; Chacón, 2009).

Al aplicar la dieta artificial con las modificaciones descritas se demostró que el desarrollo óptimo de la crianza de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** bajo condiciones de laboratorio está seriamente correlacionado con el tipo de alimentación que reciben los insectos durante su desarrollo biológico y la temperatura promedio diaria bajo la cual se desarrolla el pie de cría; es así, que el ciclo de vida de esta especie mantuvo los parámetros registrados en otras investigaciones. Estos trabajos previos también concluyeron que el desarrollo embrionario de la especie puede tardar en promedio 6 días a 20°C y 2 días a 30°C (Heinrichs & col., 2000) debido a que las bajas temperaturas favorecen la disminución de la actividad enzimática de los procesos fisiológicos de los insectos, mientras que al incrementarla temperatura, se favorece la actividad metabólica de estos y

por ende, se reduce su ciclo de vida, siempre que se encuentre bien alimentado (Mihm, 1984; Carrillo, 1980; Chacón, 2009), por esta razón a 24°C la duración del ciclo de vida de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** en la crianza de la presente investigación fue menor (Tabla 3).

En el presente trabajo el promedio de duración en la etapa de larva del cogollero fue 23,5 días. Lo cual resulta favorable si el objetivo es probar el potencial controlador de algún entomopatógeno sobre ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, ya que provee un menor espacio de tiempo, siendo el estado larval, uno de los estadios preferidos por algunos enemigos naturales (Mihn, 1984; Badii y Abreu, 2006) corroborándose la reducción del tiempo de crianza con la utilización de una dieta artificial que mostraron estudios previos con el cogollero del maíz donde se reportó que al alimentar las larvas de esta especie con una dieta artificial, la eclosión de los huevos ocurría entre dos y cuatro días con temperaturas que oscilaban entre 22°C y 30°C, las pupas tardan alrededor de siete u ocho días si se encuentran entre 22 y 30°C, mientras que los adultos tienen una longevidad promedio de 7 días a 25°C (Banegas, 1989).

Los extractos de ***Melia azedarach* L.** afectaron la alimentación de las larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, corroborándose observaciones anteriores de otros autores (Koul & Isman, 1991) donde la concentración de un extracto y la manera en que se administraron jugaron un rol importante en la determinación del tipo de respuesta.

Los ensayos de preferencia realizados en la presente investigación, resultaron eficaces para determinar la actividad deterrente del extracto de ***Melia azedarach* L.** (valores de IIA: $T_1=33,8\%$, $T_2=91,2\%$ y $T_3=60\%$) (Tala 5), de manera similar a investigaciones anteriores donde los metabolitos fueron efectivos al aplicarse sobre tejido vegetal al contrario de cuando los extractos fueron mezclados en la dieta artificial, inactivando estos compuestos (Schoonhoven, 1982).

En las pruebas de elección los extractos T_2 (250 g/l) y T_3 (350 g/l) generaron un efecto disuasivo moderado y fuerte sobre la alimentación del

cogollero, registrándose índices de inhibición alimentaria altos según Hassanali & Bentley (1987) que consideran IIA «altos» cuando los valores superan el 75% y «moderados» cuando se encuentran entre 50 y 75% (Figura 32). Estos resultados coinciden con los obtenidos para otras especies del mismo género tales como *Spodoptera eridania* (Rossetti, 2008), *Spodoptera exigua* (Del Tío, et al., 1996) y *Spodoptera frugiperda* (Carpinella et al., 2003), que no consumieron el alimento tratado con diferentes concentraciones de extracto de fruto de *Melia azedarach L.* Al contrario, la concentración de T₁ (150 g/l) inhibió sólo en un 33.8% la alimentación de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith), sin registrar diferencias significativas entre %T y %C (valor de IIA 33.8, p 0,100) lo cual coincide con experiencias previas en las que al utilizar igual tipo de extracto en una baja concentración sobre larvas de *Spodoptera ornithogalli* (Guenée) obtuvieron un IIA% del 40% (Valladares et al., 2003).

Los resultados del porcentaje de inhibición de ingesta obtenidos en este estudio son comparables con otros resultados reportados en la literatura, los cuales señalan una alta actividad antialimentaria (valores de IIA superiores al 95%) de los extractos de *Melia azedarach L.* sobre la especie *Spodoptera eridania* (valores de IIA menores al 30%) (Rossetti, 2008) y una baja actividad de extractos de la Familia Meliaceae (*Azadirachta indica A. Juss.*) sobre *Spodoptera littoralis* (Zegarra, 2010). La diferencia del efecto deterrente entre estos dos tipos de investigaciones es explicada por las metodologías usadas por los respectivos investigadores, comprobando que los extractos obtenidos de hojas senescentes tienen mayor actividad antialimentaria que los extractos de frutos maduros (Rossetti, 2008); mientras que las dosis utilizadas juegan un papel fundamental en los resultados obtenidos, evidenciando que depende de las concentraciones un mayor efecto deterrente (Zegarra, 2010).

Tras realizar la Prueba de Wilcoxon de comparación por pares, el extracto que presentó un valor de IIA% más alto fue el extracto del tratamiento T₂ (250g/l), obteniendo las diferencias más significativas entre el %T y % C (valor de IIA 91,2; p <0,05), estos resultados se explican porque

Melia azedarach L., contiene limonoides con propiedades disuasivas de la alimentación, compuestos encontrados en investigaciones que anteceden este trabajo, como: Meliantrol, melianol, meliacin, meliacarpin (Nakatani, 2001), azaderachine (Chun et al, 1994) y meliartenin (Carpinella et al, 2002), de los cuales también se ha reportado que producen efectos antialimentarios (Simmonds & al.; 2004); además de la presencia de azadiractina, un terpeno de estructura compleja (Jones et al., 1989) aislado de ***Azadirachta indica*** y de ***Melia azedarach*** (Schmutterer, 1995). De tal manera, la preparación del extracto de hojas ***Melia azedarach L.*** y su aplicación sobre las larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) permitió la bioactividad por sinergismo entre estos diferentes metabolitos secundarios que actúan al mismo tiempo, disminuyendo así la probabilidad de desarrollar resistencia a alguno de estos compuestos si los utilizáramos por separado (Valladares et al, 2003 y Isman, 2006).

Asimismo, los extractos de hoja de ***Melia azedarach L.*** de T₂ y T₃ inhibieron significativamente la alimentación de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, mejorando los índices de IIA encontrados en investigaciones en las cuales las larvas de varias especies de lepidópteros como ***Spodoptera littoralis***, ***Spodoptera frugiperda***, ***Heliothis virescens***, ***Helicoverpa zea***, ***Helicoverpa armigera*** y ***Mamestra brassicae***, son susceptibles en menor proporción a los extractos de esta Meliaceae (Blaney et al., 1990; Smutterer, 1990; Ascher, 1993). Corroborando la obtención de mejores resultados en la utilización de extractos de hojas que de otras partes de la planta como semillas (valores de IIA <50%) y en menor proporción que la obtenida con extracto (valores de IIA >95%) de fruto (Rossetti, 2008).

El efecto antialimentario de los extractos de ***Melia azedarach L.*** sobre las larvas del tercer estadio de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** fue corroborado en los ensayos sin posibilidad de elección, registrándose una marcada reducción de la ingesta del porcentaje de maíz, donde las larvas no tuvieron posibilidad de optar por un alimento distinto al que tenían. Las larvas cuyo alimento fue tratado con los extractos más concentrados de ***Melia azedarach L.*** redujeron el consumo en un alto porcentaje respecto a

los controles. En el tratamiento T₂ la reducción fue de un 67,6% y en T₃ un 74,5% (Figura 33). Una disminución de la ingesta en menor grado (52%) ha sido registrada para larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** frente a extractos de fruto procesados en un Soxhlet con etanol al 5% (Hernández & Vendramim, 1998) y usando extracto de hojas senescentes obtenidos por el mismo método al 5% y 10% redujeron el consumo en un 75% respecto a los controles (Rossetti, 2008). Gomero & Hoss (1994) observaron que las larvas de *Spodoptera eridania* consumieron un 50% más cuando se empleó extracto de hojas de ***Melia azedarach* L.** (5%), respecto al de semilla con la misma dosis. Sin embargo, al utilizar la menor concentración se presentaron diferencias entre los extractos: el de hojas senescentes redujo la ingesta en un 40% respecto al control, mientras que el extracto de fruto no afectó el consumo, contrastando con lo observado en las pruebas de elección.

Resultados semejantes fueron observados por Macleod et al. (1990), que utilizaron dos ingredientes activos aislados de ***Melia azedarach* L.** (Meliatoxin A2 y Meliatoxin B1), los cuales inhibieron la alimentación cuando las larvas de ***Spodoptera litura*** tuvieron posibilidad de elegir; sin embargo, en pruebas sin esta opción Meliatoxin B1 no redujo la ingesta. Otros extractos demostraron también mayor actividad antialimentaria sobre ***Spodoptera littoralis***, cuando las orugas tuvieron acceso al control respecto a ensayos sin posibilidad de elección (Sadek, 2003).

La mortalidad de las orugas tratadas con extracto de ***Melia azedarach* L.** se incrementó gradualmente según la concentración del extracto, alcanzando el 100% entre los días 6 para T₃, día 14 para T₂ y día 17 para T₁ (Figura 61). Mientras tanto, al quinto día murieron la totalidad de las larvas ayunadas, tiempo similar al reportado en larvas sin alimento en trabajos previos (Rossetti, 2008). Esto sugiere que aun las pequeñas cantidades de alimento consumidas, contribuyeron a la supervivencia de las larvas y el efecto tóxico no sería inmediato para todas las concentraciones, a excepción del T₃. Los valores de mortalidad se ubicaron dentro de los rangos obtenidos por otros investigadores que trabajaron con diferentes

especies de lepidópteros (Breuer & De Loof, 1998; Brunheroto & Vendramim, 2001). La mortalidad pueden ser causados por los metabolitos presentes en ***Melia azedarach L.***, que contiene lignanos con propiedades insecticidas como pinoresinol bis-epi-pinorresinol, hemicetal y diacide (Nakatani, 2001).

La actividad antialimentaria, registrada en los dos tipos de pruebas, puede haber sido la causa directa del bajo peso y la gradual mortalidad de las larvas de ***Spodoptera frugiperda (Smith)***. Los índices nutricionales permitieron observar que los extractos de ***Melia azedarach L.*** también redujeron la utilización del alimento ingerido, lo que afecta al crecimiento y la supervivencia de las larvas.

La marcada reducción de la ingesta generada por los extractos ocasionó una mínima ganancia de peso, como fue observado para otras especies de *Spodoptera* empleando extractos vegetales (Hernández & Vendramim, 1998; Schmidt et al., 1997) o sus principios activos (Isman, 1993; Martínez & Van Emden, 1999).

Las larvas de ***Spodoptera frugiperda (Smith)*** que consumieron alimento tratado con extracto T₁ de concentración 150 g/l, reportaron que sus parámetros nutricionales fueron ligeramente afectados. Esto podría deberse a que insectos ***Spodoptera frugiperda (Smith)***, están expuestos a un rango de aleloquímicos producidos por las plantas hospedadoras a las cuales afectan, y cuentan con una serie de mecanismos para degradar y desactivar estas sustancias tóxicas, como el sistema enzimático microsomal oxidasa de funciónmixta (MFO) (Qui et al., 2003). Scriber (1981) observó en orugas de ***Spodoptera eridania***, una rápida inducción del sistema MFO después de estar expuestas a varios aleloquímicos, lo que le confiere alta capacidad para detoxificar y alimentarse de una amplia variedad de plantas. Las larvas serían, entonces, capaces de detectar el extracto de hoja de concentración 150 g/l y evitarlo en pruebas de elección, mientras que al no tener posibilidad de elegir, ingieren el alimento con extracto y a través de sus mecanismos de detoxificación podrían digerirlo y crecer normalmente; sin embargo, este proceso de autoprotección se vería dificultado cuando

las concentraciones del extracto aumentan, causando el efecto toxico que se registró en las concentraciones superiores a 250 g/l.

La comparación de los índices nutricionales permiten determinar si la actividad antialimentaria ocasionada por algún aleloquímico presente en el extracto es debida a su efecto disuasorio o si es consecuencia de un modo de acción tóxico (Gols et al., 1996). Las larvas de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** presentaron tasas relativas de consumo (TRCo) menores que los controles. La TRCo en los extractos con menor concentración (T_1 y T_2) con respecto a los controles disminuyó en un 99%, en T_3 en un 72% y con respecto a Larvin la reducción fue de 87% con respecto a los controles (Tabla 6). De igual forma, las larvas presentaron una disminución del 65-98% de las tasas relativas de crecimiento (TRCr) y del 17-47% en la eficiencia de utilización del alimento ingerido (ECI) y hasta del 83% en la utilización del alimento digerido (ECD). Similares declinaciones en estos índices fueron registradas para otras larvas de Lepidoptera al tratar el alimento con extracto de fruto, hojas o semilla de ***Melia azedarach* L.** (Schmidt et al., 1997; Nathan, 2006; Nathan & Sehoon, 2006). Una caída en las ECI y ECD indica que mayor cantidad del alimento ingerido y digerido es metabolizado para energía, y menor cantidad es convertido en biomasa (Wheeler & Isman, 2001; Sadek, 2003). El desvío de la energía hacia otras rutas metabólicas, como las implicadas en la detoxificación de aleloquímicos presentes en ***Melia azedarach* L.**, puede ser la causa de la disminución en las eficiencias (Koul & Isman, 1991; Hernández & Vendramim, 1998). Dicha disminución ocasiona la inhibición del crecimiento larval y es considerada por varios autores como un efecto tóxico crónico (Wheeler & Isman, 2001; Sadek, 2003). La actividad antialimentaria no siempre está acompañada por una reducción en la eficiencia de conversión del alimento ingerido, por ejemplo, extractos de fruto de ***Melia azedarach* L.** al 5% afectaron las TRCo y TRCr en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) sin que se afectara la eficiencia de conversión (Hernández & Vendramim, 1998).

La digestibilidad aproximada, fue el único índice nutricional que no fue afectado por los extractos utilizados. Nathan & Sehoon (2006) registraron un incremento en la DA de otro lepidóptero al aumentar la dosis de extracto. Este efecto ha sido atribuido a la mayor retención del alimento en el intestino del insecto, permitiendo un aumento de la digestión y absorción de nutrientes (Koul & Isman, 1991). Contrariamente a los resultados aquí obtenidos, Nathan (2006) utilizando extracto de semilla de ***Melia azedarach L.***, observó una reducción de la digestibilidad larval y de la actividad de enzimas intestinales. La disminución de DA se ha relacionado con daños ocasionados por los extractos sobre células epiteliales y músculo liso del intestino medio, lo que puede disminuir la absorción y digestión del alimento, y afectar su transporte en el intestino (Schmidt et al., 1997).

VI. CONCLUSIONES

1. La dieta artificial de Murúa (2013) modificada en la presente investigación, fue efectiva para disminuir la duración el ciclo de vida y la mortalidad (3,2%) de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)** en la crianza en laboratorio.
2. En los ensayos con posibilidad de elecciones se evidencio la actividad antialimentaria de los extractos de ***Melia azedarach L.*** aplicados sobre larvas del tercer estadio de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, y se observó que el extracto del tratamiento T₂ (250 g/l) fue significativamente más eficaz respecto al resto de concentraciones (IIA%=91,2%) con respecto a su actividad deterrente.
3. Se demostró la acción tóxica de los extractos de ***Melia azedarach L.*** sobre larvas del tercer estadio de ***Spodoptera frugiperda* (Smith)**, resultando el extracto T₃ (350 g/l) el que presentó mayor toxicidad (mortalidad al 100% en 6 días) con respecto a las otras concentraciones de extracto y no evidencio diferencia significativa con respecto a la toxicidad del insecticida Larvin (375 g/l) (mortalidad al 100% en 5 días) normalmente usado para esta plaga.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios fitoquímicos de las especies de *Melia* encontradas en la región, las cuales ya han sido estudiadas en otros países mostrando diferentes usos.
2. Realizar aplicaciones en condiciones de campo y evaluar el efecto sobre los insectos benéficos.
3. Realizar pruebas de efecto antialimentario y tóxico en distintos ordenes y familias de insectos tanto plagas como benéficos.
4. Estudiar otras especies de plantas con potencial biocida.

VIII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de desarrollar una nueva metodología de crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) con dieta artificial, y determinar la actividad antialimentaria y el efecto tóxico del extracto vegetal de *Melia azedarach* L. sobre larvas del tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en condiciones de laboratorio, como una alternativa a los insecticidas químicos que causan contaminación ambiental. El pie de cría se obtuvo de larvas procedentes de campos agrícolas del distrito de Reque (6°52'00" latitud sur y 79°49'27" longitud oeste), de la Región Lambayeque, criadas en laboratorio con una dieta artificial de Murúa (2003) modificada en el presente trabajo. Se recolectaron hojas de *Melia azedarach* L. en el campus de la UNPRG y se prepararon los extractos por maceración (24 horas) con agua destilada esterilizada. Las concentraciones evaluadas fueron de 150 g/l, 250 g/l y 350 g/l además de contar con un testigo químico (Larvin). El uso de la dieta artificial modificada fue efectiva para criar en laboratorio al gusano cogollero del maíz presentando en la tercera generación un porcentaje de sobrevivencia del 96,8%. Comparando la actividad antialimentaria, el extracto T₂ de concentración 250 g/l fue más eficaz respecto al resto de concentraciones (IIA%= 91,2%). El extracto T₃ (350 g/l) presentó mayor toxicidad reportando mortalidad al 100% al sexto día de los bioensayos y disminuyendo significativamente los índices nutricionales en comparación con el tratamiento control (TRCr=0,11; TRCo=3,04; ECI=4,21; ECD=1,68 y DA=65,71); además de no presentar diferencias significativas con respecto a Larvin. Se desarrolló una metodología eficaz para la crianza de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en laboratorio; además, se demostró la actividad antialimentaria y tóxica los extractos de *Melia azedarach* L. sobre las larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Smith) y posibilidad de utilizarlos como herramientas para el Manejo Integrado de Plagas (MIP) para el maíz.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou, E., Zournajian, H. & Talhouk S. (2001). Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology. 125: 483-488.
- Akhtar, Y., Yeoung, Y. R. & Isman, M. B. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. Phytochemistry Reviews. 7: 77-88.
- Aliero, B. L. (2003). Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. African Journal of Biotechnology 2: 325-327.
- Allan, E. J.; Eeswara, J. P.; Jarvis, A. & Mordue (Luntz), A.; Morgan, E. and Stuchbury, T. (2002). Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* Juss and their production of azadirachtin and other important insect bioactive meta-bolites. Plant Cell Reports. 21(4): 374-379.
- Allsopp, M. (1994). Cero Dioxinas una estrategia de urgencia para la eliminación progresiva de las dioxinas. Editorial Green Peace. Cono Sur octubre 1994.
- Angulo M., Gardea, A., Vélez, R., García, R., Carrillo, A., Chaidez, C. & Partida, J. (2004). Contenido de azadiractina A en semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) colectadas en Sinaloa, México. Fitotecnia Mexicana. 27: 305-311.
- Ángulo, J. (2000). Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas. Consultado: 28 de Agosto del 2013. Formato PDF. Recuperado de www.turipana.org.
- Ascher S.K.R. (1993). Non-conventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. Arch. Insect. Physiol. 22: 433-449.

- Badii, M. & Abreu, J. (2006). Biological control: a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience*. 1(1). 82-89.
- Banegas, J. (1989). Tabla de vida del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) en dos sistemas de cultivo y prueba de dos hipótesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 23-32.
- Benerjee, B. D. (1999). The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemical. *Toxicology Letters*, 107:21-31.
- Blaney, W. M., Simmonds M. S. J., Ley S. V., Anderson J. C. & Toogood P. L. (1990). Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 55: 149-160.
- Bobadilla, M., Zavaleta, G., Gil F., Pollack, L. & Sisniegas, M. (2002). Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller "chirimoya" y *A. muricata* Linneaus "guanábana" sobre larvas del IV estadio de *Anopheles spp.* Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. peru. biol.*9(2): 64 – 73.
- Breuer, M. & A. De Loof. (1998). Meliaceous plant preparations as potential insecticides for control of the oak processionary, *Thaumetopoea processionea* (L.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Med. Fac.Landbouww. Univ. Gent*. 63/2b: 529-536.
- Brunherotto R. & Vendramim, J. (2001). Bioactividad de Extratos Aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. *Neotropical Entomology*. 30: 455-459.
- Burton, R. L. & Perkins, W. D. (1989). Rearing the corn earworm and the fall armyworm for maize resistance studies. In "Toward insect resistant maize for the third world". *Proceedings of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects*. 37-45.

- Burton, R. L. (1967). Mass rearing the fall armyworm in the laboratory. USDA. ARS: 33-162.
- Byerlee, D. & Saad, L. (1993). CIMMYT's economic environment to 2000 and beyond - a revised forecast. Mexico, DF, CIMMYT.
- Carpinella, C., Ferrayoli, C., Valladares, G., Defago, M. & Palacios, S. (2002). Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 66: 1731-1736.
- Carpinella, M., Defago, M., Valladares, G. & Palacios, S. (2003). Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with Potential Use for Pest Management. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 369-374.
- Carpinella, M., Miranda M., Almirón W., Ferrayoli C. G., Ludueña Almeida F. & Palacios S. M. (2007). In Vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. J. Am. Acad. Dermatol. 56 (2): 250-256.
- Carrillo, R.H. (1980). Determinación del parasitismo natural en larvas de gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), en Quintana Roo; Folia Entomol. Mex. 45; 111-112.
- Carrizo, P., Pelicano, A. & Podeley, A. (2006). Mortalidad de adultos de *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) provocada por extractos naturales biocidas de áfidos. Agrociencia. 9: 59 – 62.
- Castro, A. (2008). Efecto de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* en el control de *Heliothis virescens* (Fabricius) en el cultivo de Algodonero (*Gossypium hirsutum*) variedad “Del cerro”. Tesis para optar el título de licenciado en Biología – Microbiología y Parasitología. Lambayeque, Perú.
- Chacón, Y.; Garita C.; Vaglio C. & Villalba V. (2009). Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible

hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. Tecnología en Marcha, Vol. 22, N.º 4, Octubre-Diciembre 2009, 28-37.

Chaudhury, M. & Álvarez, L. (1999). A new starch-grefted gelling agent for screwworm (Diptera: Calliphoridae) larval diet. Journal of Entomology. 92:1138-1141.

Chávez, T. (2000). Aspectos bioecológicos, muestreos, umbrales de daño y métodos de control del gusano cogollero del maíz. Seminario sobre alternativas para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* J.L. Smith. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (Barquisimeto), Multigrafiado. 12-18.

Chun, R., Okamura, H., Iwagawa, T. & Nakatani, M. (1994). The structures of azedarachins, limonoid antifeedants from chinese *Melia azedarach* Linn. Bulletin of the Chemical Society of Japan. 67: 2468-2472.

CIMMYT (2012). World maize facts and trends 2011/2012. Mexico, DF.

Cohen, A. (2004). Insect diet: science and technology. Florida, Estados Unidos de América. CRC Press. 324.

Collavino, M., Pelicano, A. & Giménez, R. (2006). Actividad insecticida de *Ricinus communis* L. sobre *Plodia interpunctella* Hbn. (LEPIDOPTERA: PHYCITINAE). Rev.Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. Tomo XXXVIII. N° 1. Año 2006. 13-18.

Coria, C., Almirón, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M. & Palacios, S. (2008). Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Bioresource Technology. 99: 3066-3070.

Del Rincón, M.; Méndez, J. & Ibarra, J. (2006). Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). Folia Entomológica Mexicana. México. 152-157.

- Del Tío, R., Canoe., Martín P., J. L. Ramírez & Ocetem. E. (1996). Ensayos sobre la actividad antialimentaria de extractos de *Melia azedarach* L. y *Mentha suaveolens* E. frente a los noctuidos plaga *Spodoptera littoralis*(Boisd.) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Bol. San. Veg. Plagas 22: 133-140.
- Del Tío, R., Martín, P. & Ocete, M. (1996). Efectos de la aplicación de un extracto bruto del fruto de *Melia azedarach* L. a la dieta de *Tribolium confusum* Duv. (Coleoptera: Tenebrionidae): Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 22: 421-426.
- Dilawari, V., Singh K. & Dhaliwalg S. (1994). Effects of *Melia azedarach* L. on oviposition and feeding of *Pluteolla xylostella* L. Insect Sci. Appl. 15: 203-205.
- Ducrot, P.H. (2005). Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. 47–58.
- Fagoonee, I. (1984). Effect of azadirachtin and of a neem extract on food utilization by *Crociodolomia binotalis*. En: Schmutterer, H. & K. S. Ascher (eds.), *Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants*, GTZ, Germany. 211-224.
- FAO (2009). FAOSTAT database. Recuperado de: <http://www.fao.org>
- Fournier, V & Brodeur, J. (2000). Dose-Response Susceptibility of Pest Aphids (Homoptera: Aphididae) and their Control on Hydroponically Grown Lettuce with the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii*, Azadirachtin, and Insecticidal Soap. Environmental Entomology. 29: 568-578.
- Fuertes, C., Jurado, B., Gordillo, G., Negrón, L., Núñez, E., Esteban, M. & Távara, A. (2010). Estudio Integral De Plantas Biocidas Del Algodonero. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Ciencia e Investigación 2010; 13(1): 34-41.

- Gajmer, T., Singh, R., Saini, R. & Kalidhar, S. (2002). Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) and bakain (*Melia azedarach* L.) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*. 126: 238-243.
- Gallego, F. L. (1946). Plagas del maíz *Laphygma frugiperda* S. and A.: Estudio fundamental No. 5. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 60.
- García, J., Grisoto, E., Vendramim, J. & Machado, P. (2006). Bioactivity of Neem, *Azadirachta indica*, Against Spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on Sugarcane. *Journal of Economic Entomology*. 99: 2010-2014.
- Gols, G. J. Z., J. J. A. van Loon y L. Messchendorp. (1996). Antifeedant and toxic effects of drimanones on Colorado potato beetle larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 69-76.
- Gomero L. O. & Hoss R. (1994). Uso de extractos del «árbol del paraíso» (*Melia azedarach*) en la regulación de plagas del género *Spodoptera*. En: Gomero, L. O. (ed.), *Plantas para proteger cultivos, tecnologías para controlar plagas y enfermedades*, RAAA, Lima, Perú, 89-111.
- Gomero. O.L., (2000). Uso de plantas con propiedades repelentes e insecticidas. En: *Plantas con potencial Biocida, Metodologías y Experiencias para su Desarrollo*. Arning, I. & Velásquez, H. (Eds.). Grafica Sttefany. Lima – Perú, 13 – 25.
- Goncalves, R. & Vendramim, J. (2007). Bioatividade do Extrato Aquoso de Sementes de Nim sobre *Tuta absoluta* (Meyrick 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tres formas de aplicacao. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras. 31: 28-34.
- Gonzales, E. (2004). Alternativas de Manejo Integrado de Plagas con insecticidas biológicos y botánicos en diferentes asociados de cultivos en la comunidad de Pecora, San Francisco Libre. Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua-Nicaragua.

- Grainge, M. & S. Ahmed. (1988). Handbook of plant with pest-control properties. John Wiley and sons, Nueva York. 470.
- Guerra, H. & Clavijo, J. (1993). El control de insectos plaga y su impacto en los costos directos de producción de maíz híbrido para semilla. Boletín de Entomología. Venezuela.
- Hassanali, A. & Bentley, D. (1987). Comparison of the insect antifeedant activities of some limonoids. En: Schmutterer, H. & K. S. Ascher (eds.), Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants, GTZ, Germany, 683-689.
- Heinrichs E., Foster J., Rice M. & Molina, J. (2000). Insectos plaga del maíz en Norteamérica. Universidad de Minnesota. Minnesota, Estados Unidos. 340-341.
- Hernández, C. R. & J. D. Vendramim. (1998). Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de meliáceas sobre *Spodoptera frugiperda*. Man. Int. Plagas 48: 11-18.
- Hernández, J., Florez, Y & Vallejo, G. (2010). Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. Revista Cubana de Farmacia. 2010; 45(1)71-78.
- Herrera, A. J. (1979). Principales Plagas del Maíz. Boletín Especial de la Dirección de Agricultura y Ganadería del Perú. 10.
- Herrera, J. (2005). Evaluación de la Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de dos especies de mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha obliqua*) bajo condiciones de laboratorio. Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 45-50.

- Hoss, R. (2000). Resistencia vegetal frente a plagas y enfermedades. En: plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo. Arning, I. & Velásquez, H. Eds. RAAA. Lima – Perú. 47-59
- Iannacone J. & Lamas, G. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 65: 92-101.
- Iannacone J. & Lamas, G. (2003). Efectos toxicológicos del nim, rotenona, y cartap sobre tres microavispa parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 29: 123-142.
- Isman, M. (1993). Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. Pestic. Sci. 38: 57-63.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology. 51: 45-66.
- Jones, P.S., Ley S. V., Morgen E. E. & Santafianos D. (1989). The chemistry of the neem tree. Pp. 19-45 en: Focus of Phytochemicals-Pesticides, M. Jacobson (ed.), CRC Boca Raton, FL.
- Juan, A., Sans, A. & Riba, M. (2000). Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on Larvae of *Sesamia nonagrioides*. Phytoparasitica. 28: 311-319.
- Khalequzzaman, M. & Nahar, J. (2008). Relative toxicity of some insecticides and azadirachtin against four crop infesting aphid species. University Journal of Zoology, Rajshahi University. 27: 31-34.
- Koul, O. & M. B. Isman. (1991). Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the variegated cutworm *Peridroma saucia* J. Insect Physiol. 37 (8): 591-598.
- Kraus, W., Baumann, S., Bokelm, Keller, U., Klenka, Klingele, M., Pöhl, H. & Schwinger, M. (1987). Control of insect feeding and development by

- constituents of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. En: Schmutterer, H. & K. S. Ascher (eds.), Natural pesticides from the Neem tree and other tropical trees, GTZ, Germany, 111-125.
- Labrador, J. (2001). Estudios de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (S. & A.). Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo. 83.
- Leite, A., Boica, A., Manfre, C. & Barros, R. (2006). Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposicao de *Plutella xylostella*. Bragantia Campinas. 65: 447-457.
- Llanos, M. (1994). El maíz: su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 127-142.
- López-Olgún, J., De la Torre, M., Viñuela, E. & Castañera, P. (1998). Actividad de extractos de semillas de *Trichilia havanensis* Jacq., sobre larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner). Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 24: 629-636.
- Macleod, J. K., Moellerp. D. R., Molinski T. F. & Koulo. (1990). Antifeedant activity against *Spodoptera litura* larvae and (C13)-NMR spectral assignments of the melia toxins. J. Chem. Ecol. 16: 2511-2518.
- Marjie, V.L. (1994). Plantas; fábricas naturales para combatir plagas. Boletín N° 11. RAAA. Lima – Perú.
- Maroni, M., A. Fait & C. Colosio. (1999). Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. Toxicology Letters, 107:145- 153.
- Martínez, S. S. & H. F. Van Emden. (1999). Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversión efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Bull.Entomol. Res. 89: 65-71.

- Mihm, J.A. (1984). Técnicas eficiente para la crianza masiva e infestación de insectos, en la selección de las plantas hospedares para la resistencia del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México.
- Ministerio De Agricultura. (2012). Recuperado de: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/agricola/cultivos-de-importancia-nacional/ma%C3%ADz/producci%C3%B3n>
- Montes J. A., Espinosa N., Garrido E. & Gutiérrez F. (2008). Reproducción del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) del maíz (*Zea mays*) bajo condiciones de laboratorio. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Chiapas, México.
- Mordue, A. J. & Nisbet, A. J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. Anais da Sociedade Entomológica de Brasil. 29:615-632.
- Municipalidad Distrital de Reque (2013). Recuperado de http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/Municipalidades/1244/entidad/pm_municipalidad.asp
- Murúa, M., Virla, E. G. & Defagó V. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas, 29: 43-51.
- Nakatani, M. (2001). In: Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterisation and biological properties. Corrado Tringali. CRC PRes. 693.
- Nathan, S. & Sehoon, K. (2006). Effects of *Melia azedarach* L. extract on the teak defoliator *Hyblaea puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae). Crop Prot. 25 (3): 287-291.
- Nathan, S. (2006). Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis*

- (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). Pestic. Biochem. Physiol. 84 (2): 98-108.
- Núñez E. (2008). El espárrago peruano, manejo integrado de plagas. EN: Fuertes, C., et al. 2010. Estudio Integral De Plantas Biocidas Del Algodonero. Ciencia e Investigación 2010; 13(1): 34-41 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.
- Orozco, J., Soto, A. & Hipolito, A. (2006). Efecto de repelencia de *Crotalaria juncea*, *Galactia striata* y *Cymbopogon nardus* para el manejo de *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae). Revista de Biología e Ciencias Da Terra. 6: 179-185.
- Osores, V., Willink, E. & Costilla, M. (1982). Cría de *Diatraea saccharalis* F. en laboratorio. Bol de la EEAOC Tucumán 139: 10.
- Osuna, E. (2005). Uso del Neem para la elaboración artesanal de plaguicidas. La Paz, B.C.S, México. Folleto Técnico (10).
- Parra-Henao, G., García, C. & Cotes, J. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius polixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae). Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 47: 125-137.
- Perkins, W. D. (1979). Laboratory rearing the fall armyworm. Fla. Entomol. 62: 87-91.
- Qui, X., W. Li, Y. Tian, & X. Leng (2003). Cytochrome P450 Monooxygenases in the cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae): tissue difference and induction. J. Econ. Entomol. 96 (4): 1283-1289.
- Rodríguez, H.C. & D. Nieto. (1997). Anonáceas con propiedades insecticidas. En: Rebouças São Jose, A., I. Vilas Boas, O. Magalhães y R. Hojo (eds). Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). Bahía, Brasil. 229-239.

- Rossetti, M., Defago, M., Carpinella, M., Palacios, S. & Valladares, G. (2008). Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 67(1-2): 115-125.
- Sadek, M. M. (2003). Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). J. Appl. Entomol. 127: 396-404.
- Schmidt, G., Ahmed, A. & Breuer, M. (1997). Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). Phytoparasitica 26 (4): 164-172.
- Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Ann. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- Schmutterer, H. (1995). The Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceae plants: Sources of unique products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. VHC, Weinheim, Germany.
- Schoonhoven, L.M. (1982). Biological aspects of antifeedants. Entomol. Exp. Appl. 31:57-69.
- Scriber, J. M. (1981). Sequential diets, metabolic costs, and growth of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) feeding upon dill, lima bean, and cabbage. Oecología 51: 175-180.
- Sia-Hualal. (2004). Sistema de Información Agraria de Hualal. Nicaragua. Maíz (*Zea mays*) y las plagas comunes. Boletín informativo.
- Silva, G., Lagunes, A. & Rodríguez, J. (2003). Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezclas con carbonato de calcio en maíz almacenado. Ciencia e Investigación Agraria. 30: 153-160.

- Simmonds, M. S. J.; Jarvis, A. P.; Johnson, S.; Jones, G.R. & Morgan, E. D. (2004). Comparison of antifeedant and insectical activity of nimbin and salannin photooxidation products with neem (*Azadirachta indica*) limonoids. En: Pest Management Science. Vol. 60, no. 5; 459-464.
- Singh, P. (1985). Multiple-species rearing diets. In P. Singh & R. F. Moore (Eds.), Handbook of insect rearing. 1: 19-44.
- Soberón, G. (2004). susceptibilidad de poblaciones larvarias de *Diatraea saccharalis* Fabr. ("borer") y *Spodoptera frugiperda* ("cogollero") a la acción biocida de extractos etanólico, DCM-MeOH y acuoso de plantas de campo e in vitro de *Piper tuberculatum* Jacq. Tesis para optar el título de licenciado en Biología – Microbiología y Parasitología. Lambayeque, Perú.
- Sosa, M. A. (2002). Daño producido por *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) sobre el rendimiento del cultivo de maíz en siembra directa, según tiempos de exposición a la plaga. Provincia de Santa Fé, Argentina: INTA, Centro Regional Santa Fé. 39–45.
- Srivastava, S., M. Gupta, V. Prajapati, A.K. Tripathi & S. Kumar. (2000). Insecticidal activity of Myristicin from *Piper mullesua*. Pharmaceutical Biol. 39(3), 226.
- Trabanino, R. (2001). Guía para el manejo integrado de plagas invertebradas en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 156.
- Valdiviezo, L. & Núñez, E. (1989). Plagas del maíz y sus enemigos naturales. Boletín del Sector Agrario del Perú. 60-62.
- Valencia, O. C. (1995). Fundamentos de Fotoquímica. Editorial. Trillas. México. 154 – 155.
- Valicente, F. & Cruz, I. (1991). Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o Baculovirus. Circular Técnica No. 15. EMBRAPA.

- Valladares, G., Defagó, M. T., Palacios, S. M. & Carpinella, M. C. (1997). Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 90 (3): 747-750. 43.
- Valladares, G., Ferreira, D., Defagó, M. T., Carpinella, M. C. & Palacios, S. M. (1999). Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 70: 421-424.
- Valladares, G., Garbin, L., Defago, M., Carpinella, C. & Palacios, S. (2003). Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 62: 53-61.
- Valverde, L., Toledo, De Z. A. & Popich, S. (1995). Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep. Noctuidae). *Acta Zool. Lilloana* 43 (1): 131-143.
- Vélez, R. (1997). Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: biología y manejo integrado. Medellín Universidad de Antioquia. 428.
- Villa Castorena, M. (2004). Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) para un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.*, 43(3):307-312.
- Weinziere, R. & T., Henn (1992). Alternatives in insect mangement Biological and bionational approaches North Central Regional Extension Publicattion 401 University of Hiinois at Habana Champaing.
- Wheeler, D. & Isman, M. (2001). Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 98: 9-16.
- Zegarra, G. (2010). Actividad Deterrente y Acaricida de Principios Activos de Quinuas Amargas, Aceites Esenciales y Tarwi. Tesis para optar el Título de Licenciado en Química. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima. 32-33.