

## Evaluación de tres clases de trigo para la cría de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) como hospedante utilizado en la cría de enemigos naturales

MÉNDEZ, Lucía M.<sup>1</sup>, Eduardo N. BOTTO<sup>2</sup>, Dora FLORES<sup>1</sup>, Cynthia L. CAGNOTTI<sup>2</sup>, Silvia N. LÓPEZ<sup>2</sup> & Mariana M. VISCARRET<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Biotecnología CIB, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. E-mail: lucymenoc.biotec@gmail.com

<sup>2</sup>Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica. IMYZA-CNIA, INTA Castelar. C. C. 25 (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina.

### Evaluation of three wheat types for the rearing of *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae) commonly used on natural enemies rearing

**ABSTRACT.** The development of standard protocols for artificial rearing is essential for a suitable production of insects. The eggs of the wheat moth *Sitotroga cerealella* Olivier are used to rear the oophagous parasitoids of the genus *Trichogramma*. In the present work we evaluated the effect of three wheat types (pan, candeal, Klein Tauro) on biological parameters of the moth adults and the parasitoid *Trichogramma nerudai* (Pintureau & Gerding). Also, the content of proteins, the carbohydrates and the moisture of each wheat type were analyzed. There were significant differences in the emergence, fertility, development time and sexual ratio of moths among wheat classes. No significant differences were found in the emergence, fertility and sex ratio of the parasitoid developed on eggs of moths coming from different classes of wheat. The analysis of amino acids and lipids, the biology of the moth and certain tendency observed in the fecundity of the parasitoid suggest that the most suitable wheat types for rearing these two insects are pan and candeal.

**KEY WORDS.** Cereal moth. *Trichogramma nerudai*. Insect rearing. Biological control.

**RESUMEN.** La estandarización de protocolos para la cría artificial es esencial para lograr una producción de insectos adecuada en calidad y cantidad. Los huevos de *Sitotroga cerealella* Olivier se utilizan para la cría de parasitoides del género *Trichogramma*. En el presente trabajo se evaluó el efecto de tres tipos de trigo (pan, candeal, Klein Tauro) sobre parámetros biológicos de la polilla y del parasitoide oófago *Trichogramma nerudai* (Pintureau & Gerding). La cría de la polilla se realizó sobre cada tipo de trigo y sobre los huevos obtenidos se evaluaron aspectos biológicos del parasitoide. Las clases de trigo se diferenciaron en la calidad de sus proteínas, lípidos y contenido de humedad. Para los distintos tipos de trigo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de emergencia, la fecundidad, el tiempo de desarrollo y la proporción sexual de las polillas. No existieron diferencias significativas en el porcentaje de emergencia, fecundidad y proporción sexual de parasitoides criados sobre huevos de polillas procedentes de diferentes clases de trigo. El análisis de aminoácidos y lípidos, los resultados sobre la biología de la polilla y cierta tendencia observada en la fecundidad del parasitoide, sugieren que los trigos más adecuados para la cría son pan y candeal.

**PALABRAS CLAVE.** Polilla de los cereales. *Trichogramma nerudai*. Cría de insectos. Control biológico.

## INTRODUCCIÓN

*Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae), la polilla de los cereales, es una plaga de granos almacenados cuyos huevos son utilizados como huésped, siendo presas alternativas de varios enemigos naturales. Particularmente, desde 1930 los huevos de *S. cerealella* son utilizados para la cría de especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Tricogrammatidae), parasitoides de huevos de varias especies de lepidópteros plaga. Estas avispas usadas en estrategias de control biológico han sido también citadas sobre huevos de Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera y Neuroptera (Pinto, 1999). Inicialmente las especies de *Trichogramma* eran criadas sobre huevos de sus huéspedes naturales. Sin embargo, el mantenimiento de estos huéspedes era extremadamente caro o requería el uso de plantas frescas o dietas artificiales costosas (Hassan, 1994). La cría de *S. cerealella* y la utilización de sus huevos como huéspedes alternativos a los huéspedes naturales de estos parasitoides, representó una mejora drástica, disminuyendo costos y permitiendo contar con un insumo estable para el desarrollo de varias especies de tricogramátidos (Marston & Ertle, 1973; Lewis *et al.*, 1976; Hassan, 1994).

La elección de un huésped alternativo de cría implica, no solo tener en cuenta la disminución de costos, sino también considerar aspectos potenciales sobre la biología del enemigo natural, efectos en el desempeño del parasitoide, variaciones en el tamaño o la fecundidad en función de la dimensión y las propiedades fisiológicas del huésped, etc. (Greenberg *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2001).

Entre los factores vinculados a la mejora de la productividad en una cría de insectos se destaca un acabado conocimiento de la capacidad reproductiva y de los parámetros biológicos básicos bajo condiciones de laboratorio, proporción sexual, desarrollo de estadios inmaduros, etc. (Falp *et al.*, 1995). Asimismo, en el caso de *S. cerealella*, el sustrato de cría es otro factor a tener en cuenta, ya que los estados inmaduros se desarrollan dentro de granos, obteniéndose en particular excelentes resultados en trigo (Pérez Salazar & Pacheco Flores, 2002; Zárata *et al.*, 2003).

Otro aspecto fundamental en cualquier cría de insectos es el establecimiento del control de

calidad de la misma, con el objetivo de conocer la calidad del insecto que se está produciendo. De acuerdo con Leppla (2003), el control de calidad es practicado en algún nivel en todas las crías de insectos como una medida del éxito o fracaso del sistema de producción. Para establecerlo es necesario contar con datos de los diferentes pasos del sistema de producción. La obtención de esta información tiene un costo que es recuperado para el sistema como una ganancia cuando pueden identificarse problemas en la producción y corregirse.

Con el fin de aumentar el número y la calidad y así poder optimizar la disponibilidad de enemigos naturales, se iniciaron una serie de estudios tendientes a mejorar la cría de *S. cerealella*. En este marco, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de tres tipos de trigo sobre diferentes variables biológicas vinculadas a la cría de esta especie. Asimismo, los huevos obtenidos de las polillas desarrolladas sobre las distintas clases de trigo fueron evaluados como insumo para la cría del parasitoide *Trichogramma nerudai* (Pintureau & Gerding).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los insectos utilizados en el presente trabajo provinieron de las crías de *S. cerealella* y *T. nerudai* que se llevan adelante en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA Castelar.

Fueron evaluadas tres clases de trigo como sustrato para el desarrollo de *S. cerealella*: *Triticum aestivum* L., comúnmente llamado trigo pan; *Triticum turgidum* L. spp. *durum* (Desf.) Husn. comúnmente llamado candeal, y una variedad de trigo denominada Klein Tauro. La elección de estas clases de trigo tuvo diversas razones. En primer lugar, la cría de la polilla se ha hecho habitualmente sobre trigo candeal. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado en detalle su impacto en la cría de *S. cerealella*. Este trigo como el pan, son los trigos de mayor disponibilidad a nivel comercial. La cría de un insecto debe conllevar un protocolo factible desde la obtención de sustratos adecuados hasta la evaluación del insecto producido. Es por esto que, siendo sustratos de uso y disponibilidad frecuente, se determinó hacer su evaluación. Respecto a la variedad Klein Tauro, esta fue utilizada con fines comparativos, pero además se tuvo en cuenta

la posibilidad de obtenerla de manera continua para su eventual uso rutinario en la cría.

El ensayo se llevó adelante en una sala de cría a temperatura (media  $\pm$  error estándar)  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa (media  $\pm$  error estándar)  $50 \pm 10\%$ . Asimismo, las temperaturas desarrolladas dentro de los recipientes conteniendo cada tipo de trigo fueron registradas durante todo el estudio. Posibles diferencias entre temperaturas, dentro de los recipientes, fueron analizadas por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Statistix 7.0 para Windows). Del mismo modo, posibles diferencias en la humedad relativa fueron analizadas por un ANOVA de un factor y diferencias entre medias fueron evaluadas mediante un test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) (Statistix 7.0 para Windows).

Previo a la infestación del trigo con huevos de *S. cerealella*, cada clase de trigo fue sometida a dos tratamientos (habitualmente aplicados en la cría). Primero fue realizado el tratamiento de desinfección con fosforo de aluminio (1,71 g de fosforo de aluminio / 50 kg de trigo), luego de esto el trigo permaneció una semana en tambores plásticos cerrados. Posteriormente, fue colocado en recipientes sin tapa, en un ambiente cerrado para evitar posibles contaminaciones durante 24 h. Luego de este período se aplicó un segundo tratamiento de calor/humedad. Este consistió en humedecer el trigo colocando 12 kilos cada 3 litros de agua corriente. Luego, el trigo humedecido fue colocado en bandejas de aluminio (35 cm x 25 cm x 4cm), con la base cubierta de papel madera, a razón de 2,5 kilos de trigo por bandeja. Cada bandeja, a su vez, fue tapada con un trapo húmedo y colocada durante 1 h en un horno a  $100^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, el trigo se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Ambos tratamientos aplicados al trigo son de uso rutinario en el laboratorio. El primero, de desinfección con fosforo de aluminio, tiene por objeto eliminar todo otro insecto que no sea el objetivo de cría. El segundo tratamiento, de calor/humedad, tiene como finalidad producir un ablandamiento de los granos que faciliten la entrada al mismo de la larva 1 de la polilla.

#### **Determinación analítica de cada tipo de trigo**

De cada tipo de trigo, antes y después de los tratamientos mencionados (desinfección y calor/humedad) y previamente a la infestación con huevos de *S. cerealella*, se tomaron dos mues-

tras de 100 g cada una. Las mismas fueron remitidas para su análisis al Área de Bioquímica y Nutrición - Instituto Tecnología de Alimentos - Centro de Investigación de Agroindustria - CNIA, INTA. Para cada muestra se determinaron las siguientes variables: a-contenido de proteínas totales, b-contenido de lípidos totales, c-porcentaje de humedad y ceniza y d-contenido de hidratos de carbono. La determinación de proteínas se hizo por el método de Kjeldahl (Price *et al.*, 1994). El método de Soxhlet fue utilizado para la determinación de lípidos (AOAC, 1990). La determinación de humedad y cenizas fue realizada por métodos gravimétricos y el contenido de hidratos por diferencia.

#### **Tiempo de desarrollo de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo**

Para cada clase de trigo se realizaron 10 réplicas. Cada réplica consistió en 1 kg de trigo tratado como se indicó anteriormente y colocado en un recipiente plástico armado ad hoc (15 cm de diámetro en la base y 25 cm de alto de color blanco traslúcido). A cada recipiente se le colocó una tapa con un agujero en la parte central y se le soldó una malla metálica para ventilación.

Se tomó una mezcla de huevos, de entre uno a cinco días de ovipuestos conservados a  $8^\circ\text{C}$ , procedentes de la cría de *S. cerealella*, y cada kilogramo por clase de trigo se infestó con  $2\text{cm}^3$  de esta mezcla. De los huevos utilizados en la infestación se tomaron seis muestras (consistentes cada una en  $2,54\text{cm}^2$  de huevos adheridos con goma arábiga a una cartulina), las cuales fueron mantenidas bajo las condiciones del ensayo. A los siete días de la infestación, estas muestras fueron observadas bajo microscopio estereoscópico contabilizando el número de huevos eclosionados y no eclosionados. El porcentaje de eclosión de los huevos usados en la infestación en este estudio fue estimado como:  $[\text{n}^\circ \text{huevos eclosionados}/(\text{n}^\circ \text{huevos eclosionados} + \text{n}^\circ \text{huevos no eclosionados})] * 100$ .

A partir del quinto día luego de la infestación de las diferentes clases de trigo se tomaron 20 granos por réplica cada 48 horas durante 30 días. Los granos fueron colocados en una mezcla 50:50 de agua: alcohol 96° durante 24 horas en placas de Petri. Luego todos los granos de la muestra fueron disecados con un bisturí y se registró la presencia de individuos y el estado correspondiente (larva-pupa-adulto emergido).

El tiempo de desarrollo para cada estado se estimó como la media del día en que se observó un estado, ponderada por el número de individuos en un determinado estado. El día cero fue considerado el día de la infestación del trigo.

Se realizó un ANOVA de un factor para analizar las posibles diferencias entre las clases de trigo evaluadas, para los tiempos de desarrollo de huevo a larva 4 y de huevo a pupa. Para la fase de huevo a adulto, dado que los datos no cumplieron con los supuestos del ANOVA, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Statistix 7.0 para Windows).

### **Infestación, emergencia del adulto y proporción sexual**

En el momento en que comenzó a observarse la presencia de pupas de *S. cerealella*, se separaron 60 granos de trigo por réplica y tipo. Cada muestra fue colocada en una caja de Petri y mantenida bajo las condiciones de ensayo hasta la emergencia de todos los adultos de la polilla. Una vez finalizada la emergencia de adultos, estos fueron contabilizados y se determinó su sexo y los granos de cada muestra fueron colocados en una solución 50:50 de alcohol: agua por 24 horas. Luego se hizo la disección de éstos registrándose el número de larvas y pupas encontradas, así como el total de granos infestados / muestra / tipo de trigo.

A partir de estos datos se determinaron las siguientes variables: porcentaje de emergencia de adultos: (número de individuos emergidos / número de granos infestados)\*100, proporción sexual: [cantidad de hembras encontradas por réplica de trigo / (cantidad de hembras + cantidad de machos)]\*100, y porcentaje de infestación: (número de granos infestados/ 60 granos de muestra)\*100.

Para todas las variables, posibles diferencias entre tipos de trigo fueron analizadas por un ANOVA de un factor y las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante un test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) (Statistix 7.0 para Windows).

### **Fecundidad de la F1**

Una muestra de aproximadamente 150-200 adultos de la F1 por réplica por tratamiento se colocó en envases plásticos del mismo tipo que los utilizados en el inicio del ensayo. Día por medio, y durante cinco días, se separaron los huevos obtenidos en cada réplica y se pesó la masa

de cada muestra, con una balanza analítica. A partir de estos valores se estimó la fecundidad como la masa de huevos obtenidos / hembra/ réplica (durante una semana). Esta variable fue analizada por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Statistix 7.0 para Windows).

### **Composición de aminoácidos de los huevos obtenidos de la cría de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo**

Tres muestras de huevos (entre 25-30 huevos aproximadamente por muestra) fueron obtenidas a partir de las hembras de *S. cerealella* (F1) criadas en cada una de las clases de trigo. El contenido de aminoácidos en las muestras se determinó, por triplicado. Primero se realizó una hidrólisis ácida con Ácido Metan-Sulfónico (MSA); en una relación de 1ml de ácido por cada 0,2 mg de nitrógeno contenido en la muestra. La determinación de nitrógeno en la muestra se realizó a través del análisis Kjeldahl. La hidrólisis se llevó a cabo en tubos de vidrio bajo atmósfera de vacío en un bloque calefactor, a una temperatura de 100°C durante 24h. Los aminoácidos liberados se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando un analizador automático Biochrom 30®. Una vez realizada la separación, los aminoácidos reaccionan con Ninhidrina (derivación post-columna) y los productos fueron detectados por espectrofotometría en el espectro visible (570 y 440nm). La cuantificación se llevó a cabo utilizando un estándar interno (L-Norleucina) y comparando con un perfil de estándares comerciales (Amino Acid Standard Solution – AAS-18 – SIGMA®).

### **Efecto de la calidad de los huevos obtenidos sobre variables biológicas de *Trichogramma nerudai***

A partir de los huevos obtenidos (F1 de la cría de *S. cerealella* en cada clase de trigo) por réplica y tipo de trigo se armaron 10 tarjetas, cada una con alrededor de 200 huevos. Para ello, se tomó papel cartulina en rectángulos (1cm x 4cm) y se les colocó una traza de goma arábiga para adherir los huevos.

Cada tarjeta fue expuesta por 24 horas a una hembra adulta (de entre 24 y 48 horas de emergencia) de *T. nerudai*. La exposición se hizo colocando las tarjetas en tubos de ensayo dentro del cual se colocaron las hembras individualmente y se las proveyó con una traza

de miel. Los tubos de ensayo se conservaron hasta la emergencia de los adultos de la F1 de *T. nerudai*. Se registraron: el número de huevos parasitados eclosionados y no eclosionados. Asimismo, fueron registrados el número y sexo de individuos adultos emergidos. A partir de los valores registrados se estimó el parasitismo como: número de huevos parasitados eclosionados + número de huevos parasitados no eclosionados; y la proporción sexual de la descendencia como [(número de hembras/ número de machos + número de hembras)].

Para cada variable, el número de huevos parasitados y la proporción sexual, se realizó un análisis de varianza de un factor (tipo de trigo) (Statistix 7.0 para Windows).

## RESULTADOS

La temperatura y humedad relativa dentro de cada réplica mostraron valores diferentes en cada clase de trigo con valores máximos y mínimos también particulares (Tabla I). La temperatura registrada en la variedad Klein Tauro fue mayor que la registrada para el trigo pan y candeal, las cuales no difirieron entre sí ( $H_{2,96} = 6,87, p < 0,05$ ). En el caso de la humedad

relativa, ésta fue significativamente menor en la variedad Klein Tauro que en los otros dos tipos de trigo ( $F_{2,96} = 6,83, p < 0,05$ ; Tuckey  $p < 0,05$ ).

### Determinación analítica de cada tipo de trigo

Todas las variables evaluadas (humedad, proteínas, lípidos, cenizas, hidratos de carbono y energía) se vieron alteradas por el tratamiento de calor-humedad (Tabla II).

### Tiempo de desarrollo de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo

El tiempo de desarrollo de huevo a larva 4 difirió significativamente de acuerdo a la clase de trigo en que se desarrolló la polilla ( $F_{2,27} = 37,92; p < 0,05$ ). El valor más alto fue el registrado sobre la variedad Klein Tauro, seguido por el trigo pan y finalmente el trigo candeal (Tabla III). Asimismo, diferencias significativas fueron observadas en el tiempo de desarrollo de huevo a pupa entre las tres clases de trigo ( $F_{2,27} = 67,86; p < 0,05$ ). El mayor tiempo de desarrollo en esta etapa se observó para el trigo candeal, seguido por la variedad Klein Tauro y finalmente el trigo pan (Tabla III). El tiempo de desarrollo total (de huevo a adulto) presentó valores similares en los trigos Klein Tauro y pan siendo ambos menores al va-

**Tabla I.** Temperatura y humedad relativa dentro de cada tipo de trigo durante el ciclo de desarrollo de *Sitotroga cerealella* (°C).

T: temperatura, HR: humedad relativa, ± e.e: ± error estándar de la media.

Tipo de Trigo	T. promedio (±e.e)	T. máxima	T. mínima	HR promedio (± e.e)	HR máxima	HR mínima
Pan	27,73±0,67a	37,1	21,8	58,53±2,40a	89,0	25,0
Candeal	25,31±0,36a	30,9	22,1	56,57±1,87a	84,0	37,0
Klein	29,97±0,89b	36,4	22,2	48,13±1,81b	81,0	32,0

Para cada variable, valores seguidos por distintas letras difieren significativamente ( $P < 0,05; n=35$ ).

**Tabla II.** Análisis químico de los tipos de trigo utilizados para la cría de *Sitotroga cerealella*. Valores obtenidos antes y después del tratamiento de calor/humedad.

Variable evaluada	Pan		Candeal		KleinTauro	
	Pre tratamiento	Post tratamiento	Pre tratamiento	Post tratamiento	Pre tratamiento	Post tratamiento
Humedad (g/100g)	10,26	22,02	11,94	15,82	11,47	17,51
Proteínas totales (g/100g)*	16,15±0,11	14,18±0,28	14,19±0,28	13,51±0,31	10,14±0,13	9,59±0,03
Lípidos totales (g/100g)	1,25	1,18	1,25	1,28	1,03	1,05
Cenizas (g/100g)	1,42	1,28	1,74	1,56	1,40	1,01
Hidratos de carbono (g/100g)	70,92	61,34	70,90	67,83	75,96	70,84
Energía neta (Kcal/100g)	393,80	342,80	382,70	366,50	378,50	354,60

\*Valores promedio y desvíos estándares de tres réplicas.

lor obtenido sobre trigo candeal ( $H_{2,27}=18,30$ ;  $p=0,0001$ ) (Tabla III).

**Infestación, emergencia del adulto y proporción sexual de *Sitotroga cerealella***

El trigo pan presentó la mayor emergencia de adultos, siendo intermedia para el trigo candeal y registrándose la menor emergencia en trigo Klein Tauro ( $F_{2,27} = 17,07$ ;  $p < 0,05$ )(Fig.1).

Respecto a la proporción sexual de los individuos emergidos de *S. cerealella* no hubo diferencias significativas entre los trigos Klein Tauro y pan, mientras que hubo un sesgo hacia la emergencia de hembras en el trigo candeal ( $H_{2,27} = 6,27$ ;  $p=0,04$ ) (Fig.2).

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el porcentaje de infestación del trigo ( $F_{2,27} = 79,21$ ;  $p < 0,05$ ). Los valores obtenidos para los trigos Klein Tauro y pan fueron similares, difiriendo significativamente del valor registrado en el trigo candeal (Fig.3).

**Fecundidad de la F1**

La menor cantidad de huevos fue obtenida para polillas desarrolladas sobre trigo pan ( $3,00 \times 10^{-4} \pm 2,89 \times 10^{-5}$  g ( $n = 10$ )). La fecundidad de polillas emergidas del trigo candeal ( $7,48 \times 10^{-4} \pm 1,74 \times 10^{-4}$  g ( $n = 9$ )) no difirió significativamente de la registrada en trigo Klein Tauro ( $5,12 \times 10^{-4} \pm 2,08 \times 10^{-5}$  g ( $n = 10$ )) ( $H_{2,27} = 11,4409$ ;  $p=0,0033$ ).

**Composición de aminoácidos de los huevos obtenidos de la cría de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo**

Los aminoácidos que presentaron la mayor concentración para todos los huevos analizados, independientemente de la clase de trigo utilizada como sustrato de cría para los adultos, fueron: ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu),seguidos por glicina (Gly), alanina (Ala), serina (Ser) y leucina (Leu), mientras que lisina (Lys), arginina (Arg) y prolina (Pro) representan el último pico marcado de concentración (Fig.4).

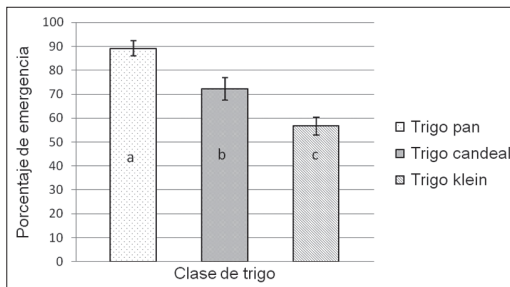
**Efecto de la calidad de los huevos obtenidos sobre variables biológicas de *Trichogramma nerudai***

El parasitismo por *T. nerudai* sobre huevos de *S. cerealella* no difirió entre huevos obtenidos de distintas clases de trigo ( $F_{2,27} = 3,01$ ;  $p = 0,07$ ). Respecto a la proporción sexual, no se observa-

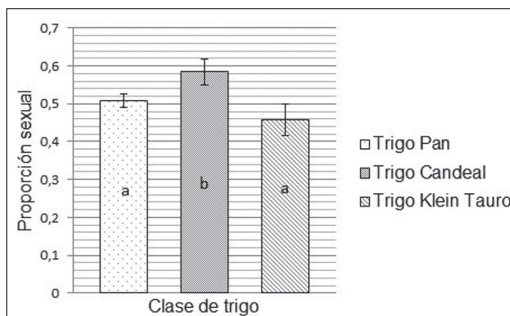
**Tabla III.** Tiempo de desarrollo (promedio  $\pm$  error estándar) de los estadios inmaduros de *Sitotroga cerealella* criada sobre tres tipos de trigo.

Tipo de trigo	Huevo - Larva 4	Huevo - Pupa	Huevo - Adulto
Pan	18,71 $\pm$ 0,31c	27,26 $\pm$ 0,31c	30,84 $\pm$ 0,31b
Candeal	17,22 $\pm$ 0,32b	32,45 $\pm$ 0,32a	36,03 $\pm$ 0,32a
Klein Tauro	20,55 $\pm$ 0,16a	29,56 $\pm$ 0,16b	30,32 $\pm$ 0,16b

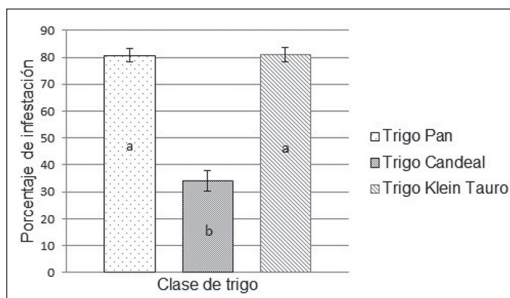
Para cada variable, valores seguidos por distintas letras difieren significativamente ( $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ).



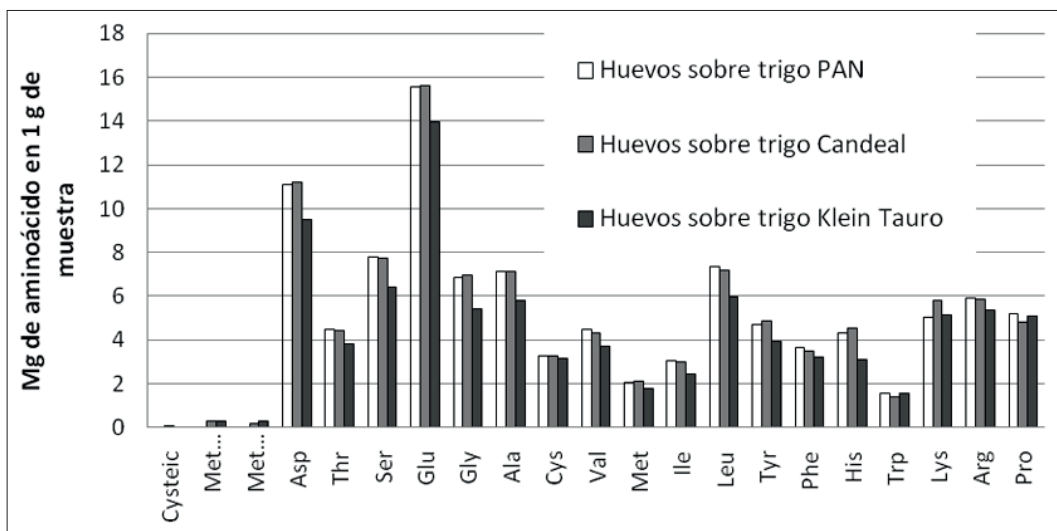
**Fig. 1.** Emergencia de adultos de *Sitotroga cerealella* (promedio  $\pm$  error estándar) registrado para cada tipo de trigo evaluado ( $n = 10$ ). Valores seguidos por distintas letras difieren significativamente.



**Fig. 2.** Proporción sexual (promedio  $\pm$  error estándar) de adultos de *Sitotroga cerealella* para cada tipo de trigo. Valores seguidos por distintas letras difieren significativamente ( $n = 10$ ).



**Fig. 3.** Infestación de *Sitotroga cerealella*. Valores seguidos por distintas letras difieren significativamente ( $n = 10$ ).



**Fig. 4.** Concentraciones de aminoácidos (mg/g) de los huevos obtenidos de la cría de *Sitotroga cerealella* en tres clases de trigo. Cysteic: ácido cisteico, MetSulphox 1: metionina sulfóxido 1, MetSulphox 2: metionina sulfóxido 2, MetSulphone: metionina sulfona, Asp: ácido aspártico, Thr: treonina, Ser: serina, Glu: ácido glutámico, Gly:glicina, Ala: alanina, Cys: cisteína, Val: valina, Met: metionina, Ile: isoleucina, Leu: leucina, Tyr: tirosina, Phe: fenilalanina, His: histidina, Trp: triptofano, Lys: lisina, Arg: arginina, Pro: prolina.

ron diferencias significativas para los parasitoides emergidos de huevos obtenidos de distintas clases de trigo ( $F_{2,27} = 1,14$ ;  $p = 0,33$ ) (Tabla IV).

## DISCUSIÓN

### Determinación analítica de cada tipo de trigo

En general las modificaciones observadas para todas las clases de trigo antes y después del tratamiento de calor-humedad son similares en cuanto a que se producen aumentos o bajas de acuerdo a la propiedad que se trate (por ejemplo la humedad siempre aumenta luego del tratamiento y el contenido de cenizas siempre disminuye). Asimismo, si bien no es posible un análisis estadístico de los datos, algunas variaciones son más drásticas que otras. Un ejemplo de esto es la ganancia en humedad para el trigo pan, la cual es mayor luego del tratamiento que lo que se observa para los otros dos tipos de trigo, mientras que la baja en energía neta es también marcada.

Cabe destacar que la temperatura y la humedad relativa dentro de cada tipo de trigo son factores que no pueden controlarse. Están vinculadas al denominado “calor metabólico” que es producto de la actividad del insecto dentro de cada tipo de grano de trigo. Es importante medir la temperatura y humedad en cada clase de trigo porque es una medida del calor metabólico

**Tabla IV.** Parasitismo y proporción sexual de *Trichogramma nerudai* criado sobre huevos de *Sitotroga cerealella* desarrolladas sobre distintos tipos de trigo.

Tipo de trigo	Parasitismo (huevos parasitados/huevos totales)	Proporción sexual (♀/(♀+♂))
Pan	25,5 ± 3,1a	0,68 ± 0,18a
Candeal	27,4 ± 3,5a	0,53 ± 0,17a
Klein Tauro	17,2 ± 1,8a	0,53 ± 0,08a

Para cada variable, valores seguidos por distintas letras difieren significativamente ( $n = 10$ ).

y da idea de las características de la actividad (en general a mayor calor metabólico, mayor actividad y por lo tanto mayor aumento de temperatura). Para controlarlo se debería ajustar para cada tipo de trigo la temperatura y humedad externa y esto no permitiría realizar el ensayo bajo condiciones comparables de laboratorio. En todo caso la generación de un mayor o menor calor metabólico es propia de la actividad de la polilla en un determinado sustrato y por lo tanto no se puede separar, a los fines de la cría de un insecto, de las características del mismo. Todos los ensayos registrados sobre la biología de *S. cerealella* se hacen bajo condiciones ambientales controladas y éstas son en general las utilizadas para las crías rutinarias (Moreira

& Maldonado, 1986; Pérez Salazar & Pacheco Flores, 2002; Hamed & Nadeem, 2012).

### **Tiempo de desarrollo de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo**

Según Moreira y Maldonado (1986) el desarrollo de huevo a adulto de *S. cerealella* es, en promedio de 35,6 días a una temperatura media de 27°C y 75% de humedad relativa al utilizar sorgo como sustrato de cría. Para el mismo sustrato, Hansen *et al.* (2004) registraron valores que oscilan entre los  $37,44 \pm 0,6$  días y  $105,87 \pm 1,57$  días dependiendo de la temperatura y humedad utilizadas. A una temperatura de 30°C y humedad inferior al 60%, Cônsoli & Amaral (1995) observaron que la duración del ciclo de vida de la polilla se extiende a 43,5 días cuando se hace la cría sobre maíz. Asimismo, otros autores han evaluado el tiempo de desarrollo de *S. cerealella* sobre otras especies de granos incluyendo maíz, avena, cebada, mijo y trigo (Chippendale, 1971; Pérez Salazar & Pacheco Flores, 2002; Hamed & Nadeem, 2012). En todos los casos, independientemente del tipo de grano utilizado, los valores registrados para tiempo de desarrollo de huevo a adulto en el presente trabajo son similares a los registrados en la bibliografía bajo condiciones de temperatura y humedad relativa similares. Las pocas diferencias encontradas podrían deberse a las distintas condiciones ambientales, al tipo de manejo que se dio a los individuos estudiados (condiciones semi-masivas, evaluación de parejas individuales, etc.), o bien a la variedad de sustratos utilizados.

Con respecto a la duración de la etapa larval los valores aquí registrados son similares a los citados en la bibliografía, los cuales oscilan entre 15 y 35 días dependiendo principalmente de las condiciones ambientales (Moreira & Maldonado, 1986; Pérez Salazar & Pacheco Flores, 2002). La etapa de pupa para los tipos de trigo aquí estudiados se encuentra entre los valores reportados por Pérez Salazar & Pacheco Flores (2002) (8-15 días) y Moreira & Maldonado (1986) (7-9 días).

En general, como en todo insecto, el tiempo de desarrollo de *S. cerealella* es variable y se encuentra ligado, entre otros factores, a las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla (Bertorelli & Rengifo, 2008). Particularmente, es importante resaltar que, a pesar de

que la temperatura fuera del recipiente de cría fue uniforme para las tres clases de trigo, esta variable dentro de los recipientes de ensayo (réplicas) fluctuó de acuerdo al tipo de trigo. Como se mencionó anteriormente, las diferencias en la temperatura y la humedad entre tipos de trigo, las cuales son una característica propia del sistema en estudio: tipo de trigo-*S. cerealella*, son los factores que más influenciaron los valores registrados para el desarrollo de los distintos estadios de la polilla.

En la Tabla I se observa que la temperatura media más alta reportada corresponde a la de la cría con trigo Klein Tauro, seguido del pan y luego del candeal. Probablemente debido a los mayores valores de temperatura registrados en los dos primeros tipos de trigo, fue en estos que se observaron los menores tiempos de desarrollo de huevo a adulto para la polilla, sin diferencias significativas entre estas dos clases de trigo. No obstante, esta apreciación no siempre es uniforme ya que por ejemplo el trabajo de Pérez Salazar & Pacheco Flores (2002) muestra un tiempo de desarrollo mayor (respecto a lo aquí observado) a una temperatura mayor, aunque también la humedad relativa fue mayor (75%) y no puede descartarse que haya tenido algún efecto sobre las variables estudiadas. Del mismo modo, Hansen *et al.* (2004) no obtuvieron descendencia utilizando maíz como sustrato a una temperatura de 35°C.

Evidentemente, no solo la temperatura sino también la humedad, las condiciones de confinamiento y otros factores que pueden no estar bajo control influyen sobre el desarrollo de esta especie.

### **Infestación, emergencia del adulto y proporción sexual de *Sitotroga cerealella*.**

La necesidad de contar con ciertos ácidos grasos esenciales y en determinada proporción ha sido observada en numerosos lepidópteros e himenópteros. La ausencia o baja proporción en la dieta de estos compuestos produce fallas en la metamorfosis de larva a adulto (Canavoso *et al.*, 2001). En el caso de los hidratos de carbono se ha observado en algunos lepidópteros que un aporte limitado produce larvas de escaso tamaño que difícilmente pueden alcanzar la madurez (Beck *et al.*, 1949). Asimismo, en otros casos se ha observado que un aporte deficiente de proteínas impide la madurez larval (Beck *et al.*, 1949).

Los estudios en *S. cerealella* muestran que



no requiere un grupo especial de esteroides para su desarrollo pero sí la presencia de ellos en la dieta, así como otros componentes lipídicos del germen de trigo (Chippendale 1971, 1972). Asimismo, en cuanto a los hidratos de carbono *S. cerealella* presenta un desarrollo retardado cuando se expone a dietas ricas en amilasa, celulosa e inulina mientras que en dietas ricas en amilopectina y glucógeno su desarrollo larval es normal. Estas diferencias se deben a la dificultad que presenta esta especie en el estado larval para la digestión de amilasa (Chippendale 1971, 1972).

Si bien en el presente trabajo no se ha hecho un estudio detallado del tipo de lípidos, hidratos de carbono u otros componentes esenciales en los granos de las distintas clases de trigo utilizadas, pueden hacerse algunas consideraciones generales. Tanto los granos de trigo candeal como de trigo pan son los que presentaron la mayor proporción de lípidos y proteínas totales, posteriormente al tratamiento de calor-humedad (Tabla II). Es en estas dos clases de trigo donde se observa el mayor porcentaje de emergencia de adultos, es decir donde la mayor proporción de larvas completó su desarrollo y alcanzó el estado adulto. Es importante destacar que el trigo pan presentó el valor más bajo en hidratos de carbono y la menor energía neta. Si bien estas comparaciones son solo descriptivas, la mayor emergencia en este trigo hace suponer que otros factores además de una presencia adecuada de lípidos y proteínas son fundamentales para el desarrollo de *S. cerealella*.

En cuanto a la proporción sexual de los adultos, Chippendale (1973) en su estudio acerca de las reservas metabólicas de larvas y pupas de *S. cerealella* menciona que el almacenaje de lípidos es muy importante en las polillas ya que en la etapa adulta no se alimentan. Además, los lípidos son utilizados en la diferenciación de adultos, en procesos de reproducción y vuelo. Los resultados aquí obtenidos, son coherentes con los reportados por el autor mencionado, ya que la mayor proporción de hembras se obtuvo para el trigo candeal que también presentó el mayor contenido de lípidos en el grano. Tanto el trigo Klein Tauro como el trigo pan presentaron la menor proporción de hembras, a pesar de que este último fue el segundo en contenido lipídico. Tal como se mencionó anteriormente es posible que otros factores, que no están sien-

do tenidos en cuenta en este estudio hayan influenciado la proporción de sexos.

Tanto para el porcentaje de emergencia como para la proporción sexual, una aproximación diferente teniendo en cuenta un mayor número de réplicas, análisis de ciertos aminoácidos y ácidos grasos, además del seguimiento de parejas de polillas de manera individual, podría permitir conocer en detalle los componentes que afectan estas variables.

Respecto al porcentaje de infestación de trigo, Quintana (1997) encontró que el valor para esta variable en granos de trigo (sin mencionar la variedad o tipo) por larvas de *S. cerealella* es de 79,50%. No obstante, Pérez Salazar & Pacheco Flores (2002) obtuvieron para su sistema de producción (trigo, 26-30°C, 70-80% humedad relativa) un porcentaje de infestación de hasta un 97,60%. Por otra parte, Hamed & Nadeem (2012) tomando en cuenta el contenido de humedad dentro de los granos de cereal (8,10-12,20%) obtuvieron porcentajes entre 74% y 88,60% utilizando distintas variedades de cereales como cebada, maíz, mijo, avena, sorgo e incluso trigo (26-27°C, 60-70% humedad relativa), teniendo el maíz el porcentaje más alto y el mijo el más bajo.

En el presente trabajo, el mayor porcentaje de infestación se obtuvo para los trigos Klein Tauro y pan ( $81 \pm 2,64\%$  y  $80,67 \pm 2,45\%$ , respectivamente). Ambos tipos de trigo presentaron la humedad más alta post tratamiento. Esta cualidad probablemente facilitó la penetración del grano por parte de la larva. Pérez Salazar & Pacheco Flores (2002) señalan que la dureza del grano puede influir en la cantidad y tamaño de los adultos que emerjan. El trigo candeal, el cual obtuvo el valor más bajo de humedad, presentó los valores más bajos de infestación.

### **Fecundidad de la F1**

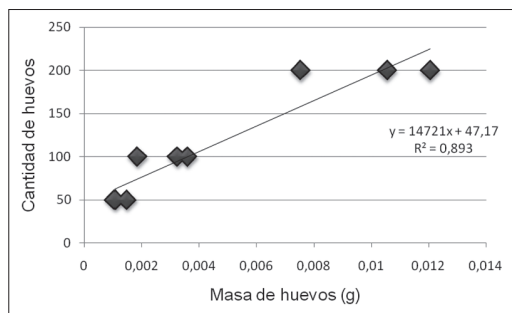
Lewis *et al.* (1976), King & Morrison (1984), Pérez Salazar & Pacheco Flores (2002) y Hansen *et al.* (2004), en estudios de tabla de vida de *S. cerealella* reportaron una fecundidad por hembra de 90 y 125 huevos/hembra a 25°C y una humedad de 44 y 80%, respectivamente. De acuerdo a la tabla de vida elaborada por Hansen *et al.* (2004), la fecundidad de *S. cerealella* disminuye conforme se aumenta la temperatura y baja la humedad. Al comparar las condiciones de este estudio (humedad relativa  $54,41 \pm 11,61$

% y temperatura de  $24,55 \pm 1,48^{\circ}\text{C}$  con la tabla de vida de Hansen *et al.* (2004), una fecundidad a  $25^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente, puede ubicarse en un promedio de  $90,03 \pm 8,20$  huevos por hembra a lo largo de toda su vida.

Como los datos sobre fecundidad, en este estudio, se cuantificaron como la masa de huevos obtenidos, se realizó una curva de regresión, similar a la descrita por Gonçalves *et al.* (2005). Se utilizó el número de huevos vs masa (g) para extrapolar los datos obtenidos del ensayo con los de la cría que se lleva a cabo en el laboratorio (la cual se realiza sobre trigo candeal). De esta forma se estimó la cantidad de huevos de *S. cerealella* a partir de las masas de huevos obtenidas en los ensayos con cada tipo de trigo y fue posible compararlos con los datos de la literatura (que son reportados como cantidad de huevos) (Fig. 5). Los promedios obtenidos para el número de huevos por hembra en tres posturas, fueron  $45.59 \pm 1.38$  para trigo pan;  $52.19 \pm 1.46$  para trigo candeal y  $48.66 \pm 1.39$  para trigo Klein Tauro.

En general, para los tres tipos de trigo, los valores de fecundidad se encuentran dentro del rango reportado por otros autores bajo condiciones ambientales similares. Es importante resaltar que los datos colectados en el presente estudio corresponden a cinco días de oviposición, mientras que los reportados en la bibliografía corresponden a todo el período de vida de las hembras (entre 8 y 12 días). Asimismo, en los resultados mencionados por otros autores, las hembras fueron colocadas en parejas y mantenidas individualmente. En el presente trabajo se las confinó masivamente, tal como se hace bajo condiciones de cría, lo cual puede haber afectado la oviposición.

Mientras que la fecundidad fue similar entre los trigos Klein Tauro y candeal, esta fue menor en trigo pan. Parte de este resultado se explica por una mayor proporción de hembras emergidas de trigo candeal y, probablemente, por su alto contenido de proteínas y lípidos. No resulta claro por qué la fecundidad es también elevada en trigo Klein Tauro, ya que la proporción de hembras emergidas fue menor y los contenidos en lípidos y proteínas también. Futuros estudios que involucren un tratamiento de los individuos con menor manipulación, así como un análisis de otras propiedades inherentes a los granos, deben hacerse con el fin de dilucidar estos resultados.



**Fig. 5.** Regresión lineal cantidad de huevos y masa de huevos obtenidos de la cría de *Sitotroga cerealella* mantenida en el Laboratorio de Lucha Biológica.

### Composición de aminoácidos de los huevos obtenidos de la cría de *Sitotroga cerealella* en cada tipo de trigo

Si bien no es posible realizar más que un análisis descriptivo de estas variables, los huevos obtenidos de polillas criadas sobre trigo pan y candeal presentaron los mayores valores de ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), alanina (Ala) y leucina (Leu).

Barret & Schmidt (1991) analizaron los huevos de *S. cerealella* con y sin corión y encontraron que las cantidades de glicina (Gly), alanina (Ala) y prolina (Pro) se deben a la composición química del corión. En general, los resultados obtenidos por los autores mencionados muestran una distribución de las concentraciones de aminoácidos similares a las registradas en el presente estudio. Asimismo, Barret & Schmidt (1991) mencionan la isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), leucina (Leu) e histidina (His) como posibles estimulantes de la oviposición de los parasitoides. Los huevos obtenidos a partir de la cría con trigo pan y trigo candeal presentaron los valores más altos de estos cuatro aminoácidos (aunque en pequeña concentración en relación con los aminoácidos más abundantes para cada tipo de trigo) seguidos del trigo Klein Tauro (Fig. 4).

### Efecto de la calidad de los huevos obtenidos sobre variables biológicas de *Trichogramma nerudai*

De acuerdo con lineamientos establecidos para especies del mismo género, la IOBC (2002) determina que la fecundidad durante los primeros 7 días desde la emergencia de las hembras (proveyéndolas con agua y miel) debe estar entre 30 y 75hijos/♀. Estos valores dependen de la especie de *Trichogramma* evaluada.

Para *Trichogramma brassicae* Bezd. se establece como adecuado un parasitismo de 40 hijos/♀/7 días, mientras que el valor para *T. ca-coeciae* Marchal es de 30 hijos/hembra y para *T. dendrolimi* Matsumura de 75 hijos/♀ para el mismo período de tiempo.

Si bien Horny (2009) registra para *T. nerudai* un valor máximo de oviposición durante los primeros 2 días de vida de una hembra de 9 ♀/♀/ día, este valor no toma en cuenta los machos ni la mortalidad de los estados inmaduros del parasitoide. Los datos registrados en el presente estudio se encuentran dentro de los esperables para la especie teniendo en cuenta que solo se registró la fecundidad para 24 horas. De hecho, Cáceres (2014) registra valores similares de parasitismo utilizando para el sistema *T. nerudai*-*S. cerealella*, una metodología equivalente a la aquí presentada.

En el caso de la proporción de sexos, se observó un sesgo hacia las hembras y aunque los valores obtenidos oscilan entre 0,68 y 0,53, no se encontró diferencia entre huevos provenientes de distintas clases de trigo.

De acuerdo con la IOBC (2002) la proporción de hembras debe ser mayor al 50% para las especies de *Trichogramma* arriba mencionadas. Esta premisa se cumple en los resultados aquí obtenidos. Para *T. nerudai* la relación fue definida para los primeros 4 día de oviposición como sesgada hacia las hembras, oscilando entre 0,5 y 0,8 (Botto et al., 2004). De acuerdo con estos registros, los valores obtenidos en el presente trabajo están dentro de los observados para esta y otras especies del género.

Cabe destacar que Hamed & Nadeem (2012) al evaluar el parasitismo y proporción sexual en la descendencia de *T. chilonis* Ishi observan diferencias entre sustratos de cría. Estas diferencias están básicamente relacionadas al tamaño de huevos de *S. cerealella* producidos sobre diferentes sustratos. Así, a mayor tamaño del huevo mayor proporción de hembras y de parasitismo. Estos valores son máximos cuando los autores mencionados usan maíz seguido por el trigo. En el presente estudio no se evaluaron posibles diferencias entre el tamaño de los huevos obtenidos, pero los valores de las variables mencionadas permiten inducir que probablemente no hubo diferencias en el tamaño de los huevos producidos sobre los diferentes tipos de trigo.

## CONCLUSIONES

La cría de *S. cerealella* sobre trigo pan presentó ventajas en comparación con los otros tipos de trigo: corta duración del tiempo de desarrollo, mayor porcentaje de emergencia de *S. cerealella* y un porcentaje de infestación elevado. En cuanto al trigo candeal, éste presentó los mejores valores en cuanto a la proporción sexual y la fecundidad.

Una mezcla de estas dos clases de trigo podría ser utilizada para una cría adecuada de *S. cerealella*.

No se evidenció un impacto de los distintos tipos de trigo en la calidad de los huevos de *S. cerealella* como sustrato de cría de *T. nerudai*.

## AGRADECIMIENTOS

A Diana Arias como colaboradora. Al CONICIT y MICIT de Costa Rica por el aporte económico brindado para la realización de este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AOAC (1990) *Official methods of analysis of AOAC International*. 15<sup>th</sup> Edition. Publ. Association of Official Analytical Chemists. Virginia, USA.
- Barret, M. & Schmidt, J.M. (1991) A comparison between amino acid composition of an egg parasitoid wasp and some of its hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **59**(1), 29-41.
- Beck, S. D., Lilly, J.H. & Satupper, J.F. (1949) Nutrition of the European corn borer *Pyrausta nubilalis* (HBN) I. Development of a satisfactory purified diet for larval growth. *Annals of the Entomological Society of America*, **42**(4), 483-796.
- Bertorelli, M. & Rengifo, R. (2008) Producción masiva de *Trichogramma* spp., en Anzoátegui, Venezuela y su importancia como alternativa ecológica en el control de plagas. *Agronomía Tropical*, **58**(1), 21-26.
- Botto, E., Horny, C., Klasmer, P. & Gerding, M. (2004) Biological studies on two Neotropical egg parasitoid species: *Trichogramma nerudai* and *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Science and Technology*, **14**(5), 449-457.
- Cáceres, M. (2014) *Efecto del almacenamiento en frío y edad de los huevos de Sitotroga cerealella (Lepidoptera: Gelechiidae) sobre el parasitismo Trichogramma nerudai (Hymenoptera: Trichogrammatidae)*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. 63 pp.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E. & Wells, M.A. (2001) Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, **21**, 23-46.
- Chippendale, M. (1971) Lipid requirements of the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella*. *Journal of Insect Physiology*, **17**(11), 2169-2177.
- Chippendale, M. (1972) Polysaccharide requirements of the Angoumois Grain Moth, *Sitotroga cerealella* (Oliv.). *Journal of Nutrition*, **102**(2), 187-194.
- Chippendale, M. (1973) Metabolic reserves of larvae and pupae of the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella*. *Insect Biochemistry*, **3**(9), 1-10.
- Cônsoi, F.L. & Amaral, B.F. (1995) Biology of *Sitotroga ce-*

- realella* (Oliv.) reared on five corn genotypes. *Journal of Stored Products Research*, **31**(2), 139-143.
- Falp, L., Vieira, V. & Tavares, J. (1995) Some reproduction aspects of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) under mass rearing. *Avances en Entomología Iberoamericana*, 367-364.
- Greenberg, S.M., Nordlund, D.A. & Wu, Z. (1998) Influence of rearing host on adult size and oviposition behavior of mass produced female *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, **11**(1), 43-48
- Gonçalves, C., Amaro, F., Figueiredo, M., Godinho, A. & Mexia, A. (2005) Productivity and quality aspects concerning the laboratory rearing of *Trichogramma* spp. (Hym.: Trichogrammatidae) and its facultitious host, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae). *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, **31**(1), 21-25.
- Hamed, M. & Nadeem, S. (2012) Effect of cereals on the development of *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) and subsequent quality of the egg parasitoid, *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Pakistan Journal of Zoology*, **44**(4), 923-929.
- Hansen, L., Skovgård, H. & Hell, K. (2004) *Sitotroga cerealella*: Life table parameters. *Journal of Economic Entomology*, **97**(4), 1484- 1490.
- Hassan, S. (1994) Production of the Angoumois grain moth *Sitotroga cerealella* (Oliv.) as an alternative host for egg parasites. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR22525.pdf>
- Horny, C. (2009) *Estudios Taxonómicos, Filogenéticos y Biológicos de especies del género Trichogramma Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para su uso en control biológico*. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina. Insectario para Lucha Biológica, IMYZA, INTA. 167p.
- IOBC (2002) Quality control guidelines for natural enemies (Update July 2002). <http://users.ugent.be/~padclerc/AMRQC/images/guidelines.pdf>
- King, E.G. & Morrison, R.K. (1984) Some systems for production of eight entomophagous arthropods. *Advances and challenges in insect rearing* (eds. King, E.G. & Leppla, N.C.), pp. 206-222. Agricultural Research Service, USDA. New Orleans.
- Leppla, N.C. (2003) Aspects of total quality control for the production of natural enemies. *Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures* (ed. van Lenteren, J.C.), pp. 19-24. CAB Publishing, London, Wallingford, CT.
- Lewis, W.J., Nordlund, D.A., Gross, H.R., Perkins, W.D., Knipping, E.F. & Voegele, J. (1976) Production and performance of *Trichogramma* reared on eggs of *Heliothis zea* and other hosts. *Environmental Entomology*, **5**(3), 449-452.
- Marston, N. & Ertle, L.R. (1973) Host influence of the bionomics of *Trichogramma minutum*. *Annals of the Entomological Society of America*, **66**(5), 1155-1162.
- Moreira, M. & Maldonado, J. (1986) Biología de *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae) polilla de los cereales almacenados en Venezuela. *Agronomía Tropical*, **35**(1-3), 117- 124.
- Pérez Salazar, O.E. & Pacheco Flores, S.A. (2002) *Determinación del ciclo biológico de Sitotroga cerealella Olivier hospedero facticio de Trichogramma pretiosum Riley, en la cría comercial del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos de la UNAN-León*. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo con Orientación en Fitotecnia. Departamento de control de plagas. León, Nicaragua, Nicaragua. 48p.
- Pinto, J.D. (1999) Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, **22**, 1- 287.
- Price, C.G., Webb, N.B., Smith, W.J., Marks, H.M. & Yoffe, A. (1994) Comparison of mercury and copper based catalysts in the Kjeldahl determination of nitrogen in meat and meat products: collaborative study. *Journal of AOAC International*, **77**(6), 1542-1556.
- Quintana, R. (1997) Estudio de tres sistemas de producción de *Sitotroga cerealella* Olivier para obtener una producción óptima de *Trichogramma pretiosum* en laboratorio UNAN- León. Universidad Autónoma de Nicaragua UNAN- LEÓN. Protocolo de Investigación. Departamento de control de plagas. León Nicaragua.
- Thomson, L., Rundle, B. & Hoffmann, A. (2001) Developing *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) as a pest management tool. *The management of diamondback moth and other crucifers pest: Proceedings of the fourth international workshop* (ed. Endersby N.), pp. 51 – 59. The Regional Institute, Melbourne, Australia.