



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Bioeficacia de la combinación del extracto de *Dodonaea viscosa* y el hongo *Isaria fumosorosea* para el control de *Spodoptera exigua* y el efecto sobre sus hemocitos

T E S I S

**(Idónea comunicación de resultados)
que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA

Ing. Agrónomo Juan Ramírez Zamora

COMITÉ TUTORAL

Director: Dr. Antonio Flores Macías

Codirector: Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez

Asesor: Dr. Rodolfo Figueroa Brito

Ciudad de México, 12 de julio de 2017

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), pertenece al padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo de investigación se realizó en:

El laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el laboratorio de Entomología del Departamento Interacción Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional.

El autor fue Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 578485.

El jurado designado por la comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, para aprobación de la tesis titulada: **“Bioeficacia de la combinación del extracto de *Dodonaea viscosa* y el hongo *Isaria fumosorosea* para el control de *Spodoptera exigua* y el efecto sobre sus hemocitos”** que presentó:

Ing. Agrónomo Juan Ramírez Zamora

El día 12 de julio del año 2017

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

Dra. Silvia Rodríguez Navarro

Secretario

Dr. Rodolfo Figueroa Brito

Vocal

Dra. Patricia Bárcenas Abogado

Resumen

Spodoptera exigua afecta aproximadamente a 130 cultivos en el mundo, entre los que destacan algodón, jitomate, maíz, sorgo y soya. En México se distribuye en gran parte del territorio. Se combate tradicionalmente con plaguicidas sintéticos. Recientemente, se sabe que algunos extractos botánicos afectan el sistema inmune celular de los insectos, interfiriendo con la función de los hemocitos, provocando mayor susceptibilidad a los patógenos. *Dodonaea viscosa* ha mostrado actividad tóxica sobre insectos del género *Spodoptera*. El hongo *Isaria fumosorosea* ha mostrado potencial para el control de insectos de diferentes Órdenes. Estos recursos podrían emplearse como una estrategia conjunta y ser una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos para el control de *S. exigua*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la bioeficacia insecticida e insectistática, de la combinación de extractos de *D. viscosa* y el hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* sobre larvas de *S. exigua*, y el efecto sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa del insecto. Las larvas de *S. exigua* fueron colectadas en Los Reyes, Puebla, y criadas en el Laboratorio de Entomología del CeProBi-IPN. La planta *D. viscosa* se colectó en Barranca Honda, Yautepec, Morelos, obteniéndose los extractos, metanólico y acetónico, de sus hojas. Para obtener los conidios de *I. fumosorosea* se adquirió el producto PAE TRON® PHC®. Se montaron cuatro experimentos: a) aplicación de los extractos de forma tópica, b) incorporación de los extractos en la dieta, c) incorporación de los extractos en la dieta para el conteo de hemocitos y d) incorporación de los extractos en la dieta y aplicación del hongo sobre las larvas. Las variables respuesta fueron: peso de larvas, porcentaje de insectos pupados, porcentaje de adultos, porcentaje de mortalidad y cantidad de hemocitos. El diseño experimental fue completamente al azar, utilizando 25 repeticiones por tratamiento; con excepción del conteo de hemocitos, donde se utilizaron cinco repeticiones. Los extractos de *D. viscosa* no presentaron efecto significativo sobre el peso de larvas, por lo que no se demostró un efecto anti-alimentario. Biológicamente, los extractos acetónicos mostraron los valores más bajos de insectos que se pasaron al estado de pupa y adulto, encontrándose diferencias significativas en el ensayo "incorporando los extractos en la dieta para el conteo de hemocitos". Los resultados significativos de la actividad insecticida se presentaron hasta la tercera semana en los ensayos con los extractos incorporados en la dieta, dándose en la etapa en que los insectos ya no causan daño a las plantas hospedantes. La cantidad de hemocitos disminuyó significativamente con respecto al testigo "agua", coincidiendo con lo reportado en otros trabajos. Al aplicar de forma conjunta el hongo con los extractos se observó que, en la tercera semana, los porcentajes de mortalidad fueron significativamente mayores a los provocados por los otros tratamientos.

Abstract

Spodoptera exigua affects approximately 130 crops in the world, including cotton, tomato, maize, sorghum and soy. In Mexico, it is distributed in a large part of the territory. Traditionally, it is fought with synthetic pesticides. Recently, it is known that some botanical extracts affect the insect's cellular immune system, interfering with the normal hemocytes function, causing greater susceptibility to pathogens. *Dodonaea viscosa* has shown toxic activity on *Spodoptera* genus insects. Entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* has shown potential to control insects of different orders. These resources could be used as a joint strategy and be an alternative to the use of synthetic pesticides for the control of *S. exigua*. The aim of this work was to evaluate the insecticide and insectistatic bioefficacy of the combination of *D. viscosa* extracts and the entomopathogenic fungus *I. fumosorosea* on *S. exigua* larvae, and the effect on the hemocytes number presents in the insect hemolymph. *S. exigua* larvae were collected in Los Reyes, Puebla, and raised in the Laboratory of Entomology, CeProBi-IPN. *D. viscosa* plants were collected in Barranca Honda, Yauatepec, Morelos, obtaining methanolic and acetonic extracts from its leaves. *I. fumosorosea* conidia were obtained from the commercial product PAE TRON® PHC®. Four bioassays were assembled: a) extracts application topically, b) extracts incorporation into the diet, c) extracts incorporation into the diet for the hemocytes count, and d) extracts incorporation into the diet and fungus application to the larvae. Response variables were: larvae weight, pupate insects percentage, adults percentage, mortality percentage and hemocytes number. Experimental design was completely random, using 25 replicates per treatment, except in the hemocytes number where were used five replicates. *D. viscosa* extracts did not have significant effect on the larvae weight, so an anti-alimentary effect was not demonstrated. Biologically, acetone extracts showed the lowest values of insects that became pupae and adults, with significant differences founded in the "extracts incorporation into the diet for hemocyte counts" bioassay. Significant results of the insecticidal activity were found until the third week in the bioassays with the extracts incorporated in the diet, stage in which insect doesn't cause damage to the host plants. Number of hemocytes decreased significantly respect to the water control, similar results were found in other studies. Mix application of the fungus with the extracts shown that, to the third week, the mortality percentages were significantly higher than the percentages caused by other treatments.

Dedicatorias

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente.

A mis hermanos, por alentarme y brindarme su cariño.

A mis familiares cercanos y amigos, por estar al pendiente de mi andar.

A Wendy Daniela, por haber sido parte impórtate de mi vida en esta etapa.

Agradecimientos

A los doctores Antonio Flores Macías, Rodolfo Figueroa Brito y David Osvaldo Salinas Sánchez, miembros de mi comité tutorial, por su apoyo académico para la realización de esta investigación.

A la Ing. Agrónoma María Eugenia Agapito Amador y a los Biólogos Joel Daniel Castañeda Espinoza, Luis Fernando Cruz García y Santos Margarito Herrera Cadena por su apoyo técnico y metodológico durante la construcción del presente trabajo.

A los doctores Salvador Hernández y Humberto Lanz, del Instituto Nacional de Salud Pública, por brindarme el inhibidor necesario para la extracción de hemolinfa.

A la maestra Lluvia de Carolina Sánchez Pérez por sus asesorías.

A Cecilia González Montes y Gisela Irineo Luis, alumnas de la Licenciatura en Agronomía de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, prestadoras de servicio social, por su ayuda.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, mi *alma mater*, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de continuar con mi formación académica en la investigación agropecuaria.

Al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por permitirme realizar la parte experimental de esta investigación en sus instalaciones.

Al laboratorio de Entomología del Departamento Interacción Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, por permitirme hacer uso ocasional de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proporcionarme el financiamiento para la realización de este trabajo.

Índice de contenidos

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1. Introducción	1
2. Marco Referencial y Teórico	2
2.1. Las plagas agrícolas y su control	2
2.2. Manejo agroecológico de plagas	3
2.2.1. Control biológico para el control de insectos plaga	3
2.2.1.1. Hongos entomopatógenos	4
2.2.1.1.1. Mecanismos de infección	4
2.2.1.1.1.1. Adhesión y germinación del conidio	4
2.2.1.1.1.2. Penetración en el hemocele	5
2.2.1.1.1.3. Desarrollo del hongo	5
2.2.1.1.2. <i>Isaria fumosorosea</i> Wize	6
2.2.2. Extractos vegetales para el control de insectos plaga	8
2.2.2.1. Metabolitos secundarios	8
2.2.2.2. Características de las plantas	9
2.2.2.3. <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.	9
2.3. Combinación entre insecticidas botánicos y hongos entomopatógenos	11
2.4. Sistema inmunológico de insectos	12
2.4.1. Hemocitos	13
2.4.2. Respuestas de defensa	14
2.4.3. Efecto de los insecticidas botánicos en el sistema inmunológico de los insectos	15
2.5. <i>Spodoptera exigua</i> Hübner	17
2.5.1. Taxonomía	17
2.5.2. Distribución, plantas hospedantes y daños	17
2.5.3. Descripción y ciclo de vida	18
2.5.4. Manejo	19
3. Objetivos	21
3.1. General	21
3.2. Particulares	21
4. Hipótesis	21
5. Materiales y Métodos	22
5.1. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	22
5.1.1. Dieta	22
5.2. Extractos de <i>Dodonaea viscosa</i>	22
5.3. Conidios de <i>Isaria fumosorosea</i>	23
5.4. Aplicación tópica de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i>	23
5.5. Incorporación de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta	24
5.6. Incorporación de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta para el conteo de hemocitos	24
5.6.1. Extracción y conteo de hemocitos	25
5.7. Incorporación de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta y aplicación del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> sobre las larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	25
5.8. Análisis estadístico	26

6.	Resultados y Discusión	28
6.1.	Aplicación tópica de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i>	28
6.1.1.	Actividad sobre el peso de las larvas	28
6.1.2.	Actividad insecticida	29
6.1.3.	Actividad sobre desarrollo del insecto	31
6.2.	Incorporación de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta	32
6.2.1.	Actividad sobre el peso de las larvas	32
6.2.2.	Actividad insecticida	33
6.2.3.	Actividad sobre desarrollo del insecto	36
6.3.	Incorporación de los extractos <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta para el conteo de hemocitos	38
6.3.1.	Actividad sobre el peso de las larvas	38
6.3.2.	Actividad insecticida	39
6.3.3.	Actividad sobre desarrollo del insecto	42
6.3.4.	Actividad sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa	43
6.4.	Incorporación de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> en la dieta y aplicación del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> sobre las larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	46
6.4.1.	Actividad sobre el peso de las larvas	46
6.4.2.	Actividad insecticida	47
6.4.3.	Actividad sobre desarrollo del insecto	51
7.	Conclusión	53
8.	Bibliografía	54
9.	Anexos	71
9.1.	Información de las fotografías originales incluidas en este documento	71

Índice de cuadros

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1. Ingredientes de la dieta para larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	22
2. Tratamientos incorporados en la dieta de las larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	24
3. Tratamientos incorporados en la dieta de las larvas de <i>Spodoptera exigua</i> para el conteo de hemocitos	25
4. Tratamientos incorporados en la dieta en combinación con la aplicación del hongo <i>Isaria fumosorosea</i> en las larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	26
5. Actividad del extracto acetónico de <i>Dodonaea viscosa</i> , aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	28
6. Actividad del extracto metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	29
7. Actividad insecticida del extracto acetónico de <i>Dodonaea viscosa</i> aplicado de forma tópica sobre <i>Spodoptera exigua</i>	30
8. Actividad insecticida del extracto metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> aplicado de forma tópica sobre <i>Spodoptera exigua</i>	30
9. Actividad del extracto acetónico de <i>Dodonaea viscosa</i> , aplicado de forma tópica, en el desarrollo de <i>Spodoptera exigua</i>	31
10. Actividad del extracto metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , aplicado de forma tópica, en el desarrollo de <i>Spodoptera exigua</i>	32
11. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, sobre el peso de larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	32
12. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, sobre <i>Spodoptera exigua</i>	34
13. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, en el desarrollo de <i>Spodoptera exigua</i>	36
14. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, sobre el peso de larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	38
15. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, sobre <i>Spodoptera exigua</i>	39
16. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, en el desarrollo de <i>Spodoptera exigua</i>	42
17. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, sobre la cantidad de hemocitos por mililitro en larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	43
18. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo <i>Isaria fumosorosea</i> aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de <i>Spodoptera exigua</i>	46
19. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo <i>Isaria fumosorosea</i> aplicado de forma tópica sobre <i>Spodoptera exigua</i>	48
20. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> , incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo <i>Isaria fumosorosea</i> , en el desarrollo de <i>Spodoptera exigua</i>	52

Índice de figuras

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Imágenes al microscopio del hongo entomopatógeno <i>Isaria fumosorosea</i> Wize	6
2. <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.	10
3. Plasmátocito, Granulocito, Oneocitoide, Esferulocito y Prohemocito de larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) observado en fresco en microscopio de contraste de fases	13
4. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	17
5. Ciclo de vida del gusano soldado <i>Spodoptera exigua</i>	19
6. Porcentaje de mortalidad de <i>Spodoptera exigua</i> provocado por los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> a los 21 días de aplicados los tratamientos	34
7. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> muertas a causa de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> suministrados en la dieta	35
8. Pupas de <i>Spodoptera exigua</i> tratadas con los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> suministrados en la dieta	37
9. Porcentaje de insectos que llegaron a la etapa adulta a los 21 días de aplicados los tratamientos	37
10. Porcentaje de mortalidad de <i>Spodoptera exigua</i> provocado por los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> a los 20 y 27 días de aplicados los tratamientos	40
11. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> muertas a causa de los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> suministrados en la dieta	41
12. Imágenes al microscopio de los hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> tratadas con los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> incorporados en la dieta artificial	45
13. Cantidad de hemocitos por mililitro presentes en la hemolinfa de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> tratadas con los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> sobre la dieta	45
14. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> infectadas por el hongo entomopatógeno <i>Isaria fumosorosea</i> en los tratamientos donde se aplicó en conjunto con los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> suministrados en la dieta	47
15. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> muertas a causa de los extractos solos de <i>Dodonaea viscosa</i> suministrados en la dieta	48
16. Porcentaje de mortalidad de <i>Spodoptera exigua</i> provocado por los extractos de <i>Dodonaea viscosa</i> solos y en combinación con los conidios de <i>Isaria fumosorosea</i> a los 21 y 28 días de aplicados los tratamientos	49

1. Introducción

El control de plagas es una problemática asociada, comúnmente, a la actividad agrícola. Especialmente, los insectos son organismos cuyo control resulta complicado, debido a su rápido crecimiento y reproducción, así como a la gran capacidad de adaptación a las condiciones favorables del hábitat donde se desarrollan (Aragón *et al.*, 2011).

El modelo de “La Revolución Verde” ha ofrecido un incremento de la productividad asociada al uso extensivo de los sistemas agrícolas y de químicos agrícolas sintéticos como los fertilizantes y plaguicidas, que han terminado por ocasionar serios problemas ambientales y de salud pública. Estos problemas han llevado a reconsiderar el paradigma actual del empleo de productos de síntesis química para el control de plagas, orientándolo hacia la búsqueda de una producción más limpia, basada en el uso de estrategias más sostenibles como la aplicación de productos botánicos y bioagentes de control biológico. Esta alternativa se fundamenta en aspectos tales como baja toxicidad, alta diversidad estructural, baja persistencia y provenir de fuentes renovables (Murillo y Salazar, 2011).

La planta *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae) ha sido de interés para los investigadores, ya que contiene metabolitos secundarios del tipo flavonoide y terpenoide (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Quintana de Oliveira *et al.*, 2012), mostrando actividad tóxica y antialimentaria sobre insectos plaga del género *Spodoptera* (Aldana *et al.*, 2014a y 2014b).

De igual manera, el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* (Wize) (Hypocreales: Cordycipitaceae), antes conocido como *Paecilomyces fumosoroseus* (Luangsa-Ard *et al.*, 2005), ha mostrado gran potencial como agente microbiológico para el control de insectos plaga de diferentes órdenes, además de ser inofensivo contra otros organismos (Hunter *et al.*, 2011).

Recientemente, se sabe que algunos insecticidas botánicos pueden afectar las reacciones inmunes de los insectos (Zibae, 2011). La inmunidad celular de los insectos, mediada por los hemocitos, consiste en la fagocitosis, nodulación y encapsulación de microorganismos agresivos (Beckage, 2008). Los extractos de plantas en niveles subletales pueden ser suficientes para interferir con la inmunidad celular de insectos, específicamente con la función normal de los hemocitos (Vey *et al.*, 2002); así, si el insecto se encuentra inmunodeficiente, la acción de los patógenos será más rápida (Zibae, 2011).

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), afecta aproximadamente a 130 cultivos hortícolas (Saeed *et al.*, 2009) entre los que se encuentran algodón, frijol, jitomate, maíz, sorgo y soya (SENASICA-SAGARPA, 2015). Esta plaga ha sido combatida tradicionalmente con plaguicidas sintéticos (Figuroa *et al.*, 2006; García y Tarango, 2009). Los recursos naturales citados, *D. viscosa* e *I. fumosorosea*, que comúnmente se utilizan de manera independiente, al manifestar actividad bioinsecticida, pueden emplearse como una estrategia conjunta, sostenible y efectiva (Sahayaraj *et al.*, 2011), y ser una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos para el control de estos insectos plaga. Por lo que la presente investigación pretende evaluar la bioeficacia insecticida e insectistática de la combinación de extractos de *D. viscosa* y el hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* sobre larvas de *S. exigua*, así como su efecto sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa.

2. Marco Referencial y Teórico

2.1. Las plagas agrícolas y su control

Las plagas de los cultivos son una de las principales causas de pérdidas de cosechas y por ende de pérdidas económicas en la agricultura mundial (Ruíz *et al.*, 2013); éstas, destruyen anualmente cerca del 35% de las cosechas principalmente por la acción de insectos, microorganismos, roedores y aves (SAGARPA, 2015). El problema se agrava en países en vías de desarrollo, como la mayor parte de los países latinoamericanos, incluyendo a México (Ruíz *et al.*, 2013).

Una plaga agrícola se define como una población de animales fitófagos, es decir que se alimentan de plantas, los cuales disminuyen la producción del cultivo, reducen el valor de la cosecha, o incrementan sus costos de producción; siendo éste un criterio esencialmente económico (Aragón *et al.*, 2011).

Comúnmente, se utilizan plaguicidas para resolver estos problemas. Dicho término, puede aplicarse a toda sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o controlar una plaga (EPA, 2012). Dentro de esta clasificación se encuentran los insecticidas.

El gran apogeo de los plaguicidas de síntesis química se registró en el periodo conocido como “Revolución Verde”, que incorporó el uso de agroquímicos y maquinaria, originando lo que hoy se califica como “crisis de la agricultura”, caracterizada por la degradación de los suelos, contaminación ambiental y diversos problemas de tipo económico, ecológico y social (Sánchez *et al.*, 2007; Barrientos, 2013).

2.2. Manejo Agroecológico de Plagas

En la actualidad, el propósito del hombre al desarrollar la agricultura ya no es solo producir volúmenes de alimentos suficientes, materia prima y divisas, sino también conservar los recursos naturales en los que la actividad agrícola se basa (Sánchez *et al.*, 2007).

Los sistemas y enfoques actuales de producción deben orientarse a mecanismos que sean sostenibles (sustentables). La “agricultura sostenible” propone el modo de practicar dicha actividad satisfaciendo las necesidades actuales de la humanidad sin comprometer a las generaciones futuras. Para ello se busca compatibilizar la parte económica, rentabilidad que permita una vida digna a los agricultores; la parte social, asegurando la alimentación con productos suficientes y saludables; y la parte ambiental, contribuyendo minimamente al deterioro del entorno (Marco y Pérez, 2011).

El Manejo Agroecológico de Plagas (MAP) es un ejemplo de lo anterior, teniendo una visión integradora y holística con todo el agroecosistema; no busca exterminar insectos, sino que trata de controlar sus poblaciones para que éstas no causen daños de importancia económica (Sánchez *et al.*, 2007). Se caracteriza por no incluir los plaguicidas convencionales; el manejo se sustenta en una restauración de la biodiversidad funcional que reactive el control biológico, el cual se complementa con alternativas ecológicamente compatibles como pueden ser las asociaciones y rotaciones de cultivo, manejo de arvenses, trampas, uso de semioquímicos, utilización de extractos de plantas con propiedades adversas a las plagas e insecticidas biológicos (Bahena, 2003).

2.2.1. Control biológico para el control de insectos plaga

El control biológico es el uso de enemigos naturales para reducir poblaciones de insectos plagas a densidades menores de manera temporal o permanente (Van Driesche, 2008). El éxito de esta alternativa de manejo de plagas depende de los enemigos naturales usados, pues constituyen el recurso fundamental (Nicholls, 2008). Los enemigos naturales comprenden utilización de entomófagos y entomopatógenos. Los entomófagos son insectos que consume o parasitan al insecto plaga, se dividen en: depredadores y parasitoides. Los entomopatógenos son microorganismos que ocasionan enfermedad a los insectos, entre los que se encuentran: hongos, bacterias, virus y nemátodos (Huerta y Sánchez, 2012).

2.2.1.1. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son muy importantes para el control de plagas dentro de los agroecosistemas, son reconocidos como agentes de control biológico por su capacidad natural de producir diferentes compuestos que causan enfermedad y muerte de los insectos (Assaf, 2007; Dias *et al.*, 2008; Mustafa y Kaur, 2009).

A nivel mundial, los más utilizados son *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) y *Lecanicillium lecanii*, además se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y continuamente se han aislado nuevas cepas (De Faria y Wraight, 2007).

Entre las ventajas de los HE se encuentra el mecanismo de invasión que les permiten atravesar la cutícula de los insectos, actuando como insecticidas de contacto y por lo tanto no necesitan ser ingeridos (Charnley y Collins, 2007). Su aplicación y manejo no representa peligro para el hombre y son inocuos en los productos agrícolas (Leng *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2012).

En México, los hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Hirsutella*, *Aschersonia* y *Nomuraea* son utilizados para atender problemas de plagas de importancia fitosanitaria para el país como las langostas, chapulines, gallina ciega, mosca pinta, mosquita blanca, pulgón café y el psílido asiático de los cítricos (SENASICA, 2015).

2.2.1.1.1. Mecanismos de infección

El desarrollo de la infección se divide en tres fases: (a) adhesión y germinación del conidio en la epicutícula del insecto, (b) penetración en el hemocele y (c) desarrollo del hongo, que generalmente produce la muerte del insecto (Téllez *et al.*, 2009).

2.2.1.1.1.1. Adhesión y germinación del conidio

El conidio es adherido por contacto en la epicutícula del insecto, la adhesión de conidios, está mediada en parte por las proteínas de la superficie celular conocidas como hidrofobinas (Zhang *et al.*, 2012); la germinación ocurre con el hinchamiento del conidio, favorecido por una alta humedad y por carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Fang *et al.*, 2007). Dependiendo de la especie de HE éste desarrolla un haustorio (Srisukcha *et al.*, 2005), o una sustancia mucilaginosa llamada adhesina (Wang y St Leger, 2007), los cuales mantienen el conidio unido a su huésped para que inicie la formación del tubo germinativo (Pedrini *et al.*, 2007). La

hidratación del conidio es favorecida por la acción anti desecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas (Wang *et al.*, 2008).

2.2.1.1.1.2. Penetración en el hemocele

El tubo germinativo busca y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores (Wessels, 1999). La penetración es posible debido a la acción combinada de dos mecanismos, uno físico y uno bioquímico. El primero, consiste en la presión ejercida hacia el interior del insecto por el tubo germinativo, que deforma la capa cuticular rompiendo las áreas esclerosadas; en el segundo, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiosas, lipasas que van degradando la cutícula (Boldo *et al.*, 2009). Las enzimas tienen un efecto específico sobre cada uno de los componentes de la cutícula; las lipasas degradan la epicutícula, las proteasas degradan el material proteico y la quitina es degradada por quitinasas, facilitando la penetración física (Villegas, 2008). Estas enzimas degradan los sustratos proporcionando a su vez nutrientes al hongo (Zhao *et al.*, 2006).

La penetración también puede surgir a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto; la humedad no es una limitante en el tracto alimenticio, el conidio puede germinar rápidamente en este ambiente, aunque los fluidos digestivos pudieran destruir o degradar las hifas. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por la micosis (Inglis *et al.*, 2001).

2.2.1.1.1.3. Desarrollo del hongo

Cuando la hifa llega al hemocele la mayoría de los hongos realizan una diferenciación celular de micelio a levaduriforme llamadas blastósporas, que permite evadir el sistema inmune del insecto (Zhang y Xia, 2009). Posteriormente, se produce la invasión y proliferación de las hifas en estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hematocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear, además de causar parálisis celular (Pal *et al.*, 2007). Las hifas secretan un antibiótico, que ataca las bacterias del intestino (Wong, 2003). La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis.

La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes. Finalmente,

si las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto enfermo a través de las aperturas naturales (boca, ano, espiráculos) membranas intersegmentales y en el exterior forma sus estructuras fructíferas y las esporas. Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad, desorientación y cambian de color (Téllez *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2013).

2.2.1.1.2. *Isaria fumosorosea* Wize

Las especies del género *Isaria* se encuentran en el *phylum* Ascomycota y la clase Sordariomycetes (Humber *et al.*, 2011). *Isaria fumosorosea* (antes conocido como *Paecilomyces fumosoroseus* Wize; Luangsa-Ard *et al.*, 2005) pertenece al orden Hypocrales (Yokoyama *et al.*, 2006) y a la familia Cordycipitaceae (Humber *et al.*, 2011).

Numerosos estudios moleculares han demostrado una gran variabilidad dentro de la especie, por lo tanto, es más apropiado referirse a *I. fumosorosea* como un complejo de especies en lugar de una sola especie (Zimmermann, 2008).

I. fumosorosea se encuentra comúnmente en el suelo, pero se ha reportado en plantas, agua, y con menor frecuencia en el aire. Este hongo está ampliamente distribuido en todo el mundo, se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida (Zimmerman, 2008). Se ha aislado de más de 40 especies de artrópodos de 10 órdenes diferentes principalmente lepidópteros (Hoy *et al.*, 2010).

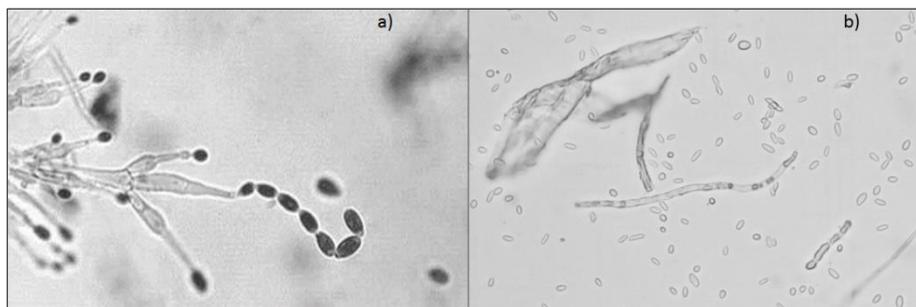


Figura 1. Imágenes al microscopio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize. a) Fotografía tomada de Resiliencia Agroorgánica <http://ragroorganica.com>. b) Fotografía original.

Durante los últimos años, se ha incrementado el interés en este hongo porque ha mostrado gran potencial como agente microbiológico para el control de insectos plaga pertenecientes a diferentes Ordenes (Zimmermann, 2008; Avery *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Hunter, 2011; Flores *et al.*, 2013).

I. fumosorosea se utiliza en micoinsecticidas y micoacaricidas en todo el mundo (De Faria y Wraight, 2007). Estos se consideran seguros y no tóxicos para los seres humanos (Dalleau-Clouet *et al.*, 2005), y parecen tener efecto mínimo en la mayoría de los organismos no-objetivo e insectos benéficos cuando se utiliza la formulación apropiada (Zimmerman, 2008).

Como la mayoría de los hongos entomopatógenos, *I. fumosorosea* infecta a su huésped atravesando la cutícula. Varios metabolitos, entre los que se encuentran proteasas, quitinasas, quitosanasas y lipasas (Ali *et al.*, 2010), permiten que el patógeno penetre físicamente al insecto rompiendo la cutícula y se disperse a través del hemocele. Los insectos susceptibles expuestos a las blastosporas y conidios del hongo muestran disminución en el crecimiento y altos niveles de mortalidad (Dunlap *et al.*, 2007).

Varios factores, tanto bióticos como abióticos, influyen sobre el crecimiento, la estabilidad y la patogenicidad de *I. fumosorosea*. Estos incluyen temperatura, humedad relativa, radiación y planta huésped del insecto diana (Zimmerman, 2008).

Se ha reportado que este hongo crece a temperaturas comprendidas entre los 5 y 32 °C, con una temperatura óptima alrededor de los 25 °C (Fargues y Bon, 2004). Otros estudios proporcionan evidencia de que *I. fumosorosea* se adapta mejor a las condiciones de clima templado que fluctúan entre los 28 °C y 43% HR en el día a 15 °C y 98% HR por la noche (Bouamama *et al.*, 2010). Sin embargo, dado que *I. fumosorosea* es un complejo de especies, existe una gran variabilidad en el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el crecimiento de diferentes aislamientos en todo el mundo (Zimmerman, 2008).

Los conidios de *I. fumosorosea* son altamente susceptibles a las altas temperaturas (Fargues y Bon, 2004). De hecho, esta baja termotolerancia es uno de los principales impedimentos para el almacenamiento y la aplicación de biopesticidas fúngicos en un entorno agrícola (Kim *et al.*, 2010).

La exposición a la luz solar puede tener graves efectos en la supervivencia de *I. fumosorosea* (Zimmerman, 2008). Estudios demuestran que la radiación UV, en particular longitudes de onda en el UV-A y la región UV-B son los más perjudiciales (Fargues y Bon, 2004).

Las plantas huésped de insectos también pueden afectar a la viabilidad de *I. fumosorosea* debido a la producción de aleloquímicos, que puede inhibir el crecimiento del hongo (Zimmerman, 2008). Algunas sustancias, sobre todo de ácido tánico, solanina, camptotecina, xantotoxina y tomatina

reducen la germinación de blastosporas y conidios. Los tres últimos también inhiben el crecimiento del micelio (Lacey y Mercadier, 1998)

2.2.2. Extractos vegetales para el control de insectos plaga

El empleo de plantas para el control de insectos plaga, tiene grandes perspectivas, ya que producen una amplia diversidad de sustancias biológicamente activas que afectan el crecimiento y desarrollo de otros organismos y pueden brindar protección contra la herbivoría (Isman y Akhtar, 2007). Estos productos vegetales disuaden o previenen del ataque y juegan un papel importante en la ecología y fisiología de insectos fitófagos (Zoubiri y Baaliouamer, 2014).

Los extractos vegetales pueden mostrar actividad insecticida, repelencia a plagas, estimulación o inhibición de la alimentación, o de la oviposición, y regulación del crecimiento de insectos (Toledo e Infante, 2008; Zoubiri y Baaliouamer, 2014). Estas sustancias naturales se degradan en corto tiempo, no constituyen peligro de contaminación al ambiente y la resistencia se desarrolla más lentamente. Además, los efectos en parasitoides y depredadores son limitados o no existen (Leng *et al.*, 2011).

Los extractos se pueden obtener utilizando disolventes orgánicos de diferente polaridad, con el objeto de extraer la mayor cantidad de metabolitos de las plantas y de esta manera potenciar sus efectos sobre las plagas a controlar (Auger y Thibout, 2004; Ducrot, 2004).

2.2.2.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de las plantas son aquellos compuestos químicos sintetizados por éstas, que no cumplen funciones esenciales y su ausencia no representa un riesgo para ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario (Esquivel *et al.*, 2013). Estas sustancias intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Bullangpoti *et al.*, 2012).

La eficacia de los extractos vegetales ha contribuido a la identificación de metabolitos secundarios con actividad insecticida. Sin embargo, muchos metabolitos secundarios, como insecticidas o disuasorios alimentarios, aún se encuentran en estudio (Ulrichs *et al.*, 2008). Entre estos metabolitos secundarios se hallan alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos y terpenoides (Azcón, 2003).

Algunos de estos ingredientes activos se han identificado en plantas de las familias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiateae y Piperaceae (Regnault *et al.*, 2004; Ulrichs *et al.*, 2008; De Souza

et al., 2009), Annonaceae, Cannellaceae, Labiateae, Meliaceae, Mimosaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Solanaceae (Ybarra *et al.*, 2005; Isman *et al.*, 2006), Fabaceae (García *et al.*, 2004).

2.2.2.2. Características de las plantas

Las características que debe tener la planta, de la cual se extraerá el insecticida botánico con la finalidad de aprovecharla al máximo, sin deteriorar el ecosistema son (Rodríguez, 1993; Silva *et al.*, 2002):

- a) ser perenne
- b) estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o que se pueda cultivar
- c) usar órganos renovables de la planta (hojas, flores o frutos)
- d) no ser destruida cada vez que se necesite recolectar material (evitar el uso de raíces y cortezas)
- e) requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización
- f) tener usos complementarios (como medicinales)
- g) no tener un alto valor económico
- h) ser eficaz en bajas dosis

2.2.2.3. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

Dodonaea viscosa (L.) Jacq., fue descrita por Pierre Edmond Boissier en el libro *Enumeratio Systematica Plantarum, quas in insulis Caribaeis*, editado por Nikolaus Joseph von Jacquin en el año 1760, con la siguiente clasificación.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotiledónea / Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Sapindaceae

Género: *Dodonaea*

En México se le conoce comúnmente con los nombres: aria, cuerno de cabra, chapulixtle, chapuliz, granadina, guayabillo, hierba de la cucaracha, huesito, jarilla, munditos, ocotillo, palomilto, tapa chile, tarachico (Martínez, 1979).

D. viscosa es un arbusto o árbol pequeño perennifolio que puede alcanzar hasta cinco metros de altura; presenta hojas simples, brillantes, glanduloso-resinosas y olorosas; ápice comúnmente

agudo, de 4 a 15 cm de largo, con inflorescencias axilares y terminales en la punta de las ramillas (Rzedowski y Calderón, 2006). Presenta flores durante la primavera y el verano. Las plantas son dioicas, es decir, las flores masculinas y femeninas se encuentran en plantas separadas. El polen se dispersa por el viento. Una vez fecundadas, las flores cambian de un color verde o crema a un color rojo brillante. Produce semillas aladas de aproximadamente 2 cm de tamaño, por lo cual su dispersión por el viento favorece su diseminación (McDowell, 2007).



Figura 2. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

Por su amplia distribución en México, es considerada una planta nativa; sin embargo, en realidad es una especie cosmopolita (Juan-Pérez, 2013). En los estudios taxonómicos de Rzedowski y Calderón (2006) y Calónico-Soto (2011) se menciona que *D. viscosa* se distribuye en todos los estados del país, con excepción de Tabasco, además de Estados Unidos, Centro y Sudamérica, África, Asia y Oceanía.

Las condiciones geográficas y ambientales donde crece y se desarrolla el chapulixtle no son determinantes para su distribución espacial, puede habitar desde el nivel del mar hasta los 2 600 msnm (Rzedowski, 2001). En el territorio mexicano, los lomeríos, laderas, barrancos, afloramientos rocosos, zonas desérticas y bordes de corrientes son las geofomas donde crece y se desarrolla, aunque, es común encontrarle en ambientes deteriorados por los incendios, espacios adyacentes a carreteras, áreas de pastoreo sin control y suelo con procesos erosivos (Juan-Pérez, 2013).

En cuanto al clima, la planta de *D. viscosa* tolera tanto climas semiáridos, como subhúmedos, preferentemente con sequía invernal. Los climas húmedos con lluvias todo el año no son favorables

para su supervivencia, ya que la abundancia de humedad en el suelo limita su crecimiento y desarrollo. Se adapta fácilmente a temperaturas altas y oscilaciones tanto diarias como estacionales, además, soporta heladas leves (Juan-Pérez, 2013).

En diversas regiones de México, el chapulixtle tiene importancia para la agricultura, por las condiciones de dureza de su madera, los tallos y ramas son utilizados para producir tutores en cultivos hortícolas. También es utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y enfermedades de la piel (Juan-Pérez, 2013).

Estudios fitoquímicos señalan que *D. viscosa* contiene metabolitos secundarios del tipo flavonoide y terpenoide. Hsu y Chen (1971) aislaron de las hojas un diterpeno llamado ácido hautriwaico. Sachdev y Kulshreshtha (1983) reportaron la presencia de un flavonoide con una cadena isoprenoide además, aislaron seis flavonoides conocidos como 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxi-flavona, santina, pendulentina, aliarina, pinocembrina y 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona. Sachdev y Kulshreshtha (1986) encontraron un flavonoide prenilado aislado de las partes aéreas llamado viscosol. Cao *et al.* (2009) señalaron la presencia de dos saponinas triterpenoides en las raíces de plantas colectadas en Madagascar. Quintana de Oliveira *et al.* (2012) reportaron la presencia de tres diterpenos ent-labdanos en un extracto etanólico de las partes aéreas del arbusto.

Aldana *et al.* (2014a y 2014b) realizaron estudios para evaluar la bioactividad insecticida de extractos metanólicos de *D. viscosa* de partes aéreas para el manejo del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), detectando actividad tóxica al mezclarlo con la dieta, produciendo un efecto negativo sobre el peso de las larvas y ocasionando mortalidad en larvas y pupas.

2.3. Combinación entre insecticidas botánicos y hongos entomopatógenos

Una combinación de hongos entomopatógenos con insecticidas a base de plantas puede proporcionar una estrategia de manejo de plagas más sostenible, más eficaz y a un costo reducido (Sahayaraj *et al.*, 2011). Sirajuddin y Anggraeni (2014) reportaron que la combinación del hongo *Beauveria bassiana* y los extractos de *Mirabilis jalapa* aceleraron y aumentaron la mortalidad de larvas de *Crocidolomia pavonana* (Lepidoptera: Pyralidae).

Por lo anterior, se hace necesario el estudio de la compatibilidad de los extractos botánicos con los hongos entomopatógenos para potencializar su eficacia combinada, ya que los primeros podrían inhibir en menor o mayor medida el desarrollo y la reproducción de los patógenos (Oliveira *et al.*, 2003; Sahayaraj *et al.*, 2011).

Sahayaraj *et al.* (2011) llevaron a cabo un estudio para evaluar el impacto de los patógenos fúngicos (*B. bassiana*, *P. fumosorosea* y *V. lecanii*) en algunos bioplaguicidas comerciales formulados a base de plantas (BioSpark®, Phytophrate®, Exodos®, Biodos® y Neemgold®) y algunos extractos de plantas que poseen propiedades insecticidas (partes aéreas de *S. nodiflora*, *P. tomentosa*, *V. negundo*, *I. carnea*, *P. aquilinum* y semillas de *A. squomosa*), contra plagas de insectos del cultivo de cacahuete, encontrando compatibilidad en la mayoría de las combinaciones probadas.

Numa *et al.* (2011) reportaron también la compatibilidad de los hongos *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, en combinación con extractos de plantas de ajo y pimienta, complementando su acción con depredadores de ácaros, evaluando su eficacia sobre el ácaro *Tetranychus urticae*, plaga de las rosas; encontrándose que al liberarse por separado los depredadores y con la combinación de los hongos y los extractos, se obtuvieron mejores resultados para el control del ácaro.

2.4. Sistema inmunológico de insectos

Los insectos tienen un apto sistema inmune en contra de las infecciones microbianas a las que están expuestos en su entorno (Beckage, 2008), el cual se clasifica en tres grupos (Moreno, 2010):

- El primero está conformado por barreras estructurales como la cutícula del exoesqueleto, la cual es extremadamente rígida y protege del daño mecánico al insecto, situación que sería propicia para la penetración de patógenos hacia el interior del organismo, y causaría infecciones (Moreno, 2010).
- El segundo mecanismo, conocido como respuesta celular, está mediado por los hemocitos, células especializadas que reconocen, controlan y matan patógenos; los cuales empiezan a actuar cuando los patógenos cruzan las barreras estructurales. Esta respuesta consiste en la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación de los microorganismos agresivos (Stanley, 2006; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Beckage, 2008).
- El tercer mecanismo es la respuesta humoral, que incluye la síntesis de moléculas secretadas o intercelulares, las cuales son producidas en las glándulas reproductivas, por las células de tracto digestivo, los hemocitos y el cuerpo graso. Esta respuesta incluye varios péptidos antimicrobianos, cascadas enzimáticas que regulan la coagulación y melanización de la hemolinfa, y la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (Stanley, 2006; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Beckage, 2008).

2.4.1. Hemocitos

El hemocele es la cavidad del cuerpo del insecto, este contiene hemolinfa, la cual transporta nutrientes, productos de desecho y varias micro y macromoléculas. En la hemolinfa circulan diversos tipos de hemocitos, los cuales son los mediadores de la respuesta inmune celular (Lavine y Strand, 2002; Stanley, 2006; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Beckage, 2008).

Los nombres más comunes utilizados para hacer alusión a los diferentes tipos de hemocitos son: granulocitos, plasmaticos, esferulocitos, oenocitoides y prohemocitos; estos en especies de diversos Órdenes incluyendo Lepidoptera, Ortoptera, Blattodea, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera y algunas especies de Diptera. (Lavine y Strand, 2002; Ribeiro y Brehelin, 2006). Sin embargo, no existen todos estos tipos de hemocitos en todas las especies de insectos (Lamprou *et al.*, 2007; Strand, 2008).

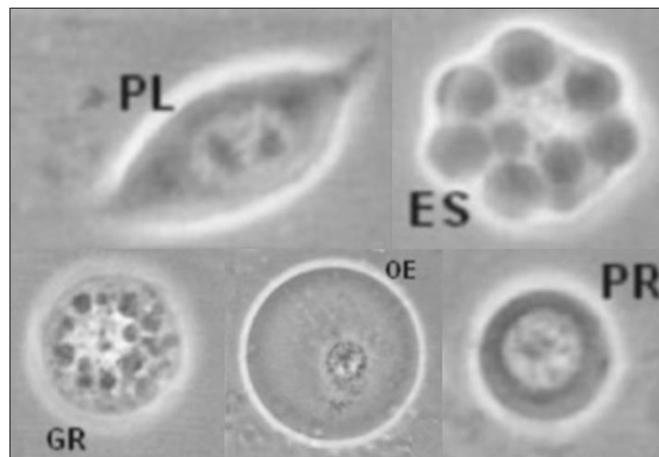


Figura 3. Plasmatico (PL), Granulocito (GR), Oenocitoide (OE), Esferulocito (ES) y Prohemocito (PR) de larva de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) observado en fresco en microscopio de contraste de fases (De Negreiro *et al.*, 2009).

A la fecha, no existe una terminología uniforme para nombrar a los hemocitos en las diferentes especies de insectos. Por ejemplo, los hemocitos con el nombre de plasmaticos, células de cristal y lamelocitos en *Drosophila* (Diptera) son muy similares, morfológicamente y funcionalmente, a hemocitos llamados granulocitos, oenocitoides y plasmaticos, respectivamente, en lepidópteros. El uso de diferentes nombres para estas células, a menudo, conduce a confusión; especialmente,

para las personas poco familiarizadas con el tema o que tienen limitada experiencia trabajando con hemocitos de diferentes grupos de insectos (Lavine y Strand, 2002; Ribeiro y Brehelin, 2006).

Los plasmotocitos de los lepidópteros son los hemocitos que forman las cápsulas alrededor de patógenos o de cuerpos extraños demasiado grandes para ser fagocitados, también forman nódulos alrededor de masas de material necrótico bacteriano melanizado (Lavine y Strand, 2002).

Una de las funciones principales de los granulocitos de lepidópteros es la fagocitosis (Strand *et al.*, 2006). Los granulocitos también han demostrado ser las primeras células que entran en contacto con los patógenos o los cuerpos extraños, liberando en ese momento su contenido granular, que sirve para atraer a los plasmotocitos o al menos los ayuda para construir la cápsula o nódulo (Ribeiro y Brehelin, 2006; Strand, 2008).

En los oenocitoides de los lepidópteros está presente la fenoloxidasa (PO), enzima clave en el proceso de melanización, una de las respuestas inmunes innatas de los insectos (Ribeiro y Brehelin, 2006; Strand, 2008).

Las funciones de los esferulocitos, hasta la fecha, son totalmente desconocidas (Ribeiro y Brehelin, 2006; Strand, 2008).

Los prohemocitos, en todas las especies estudiadas, son los precursores de todos los tipos de hemocitos diferenciados (Ribeiro y Brehelin, 2006; Strand, 2008).

2.4.2. Respuestas de defensa

Existe un número de respuestas inmunes frecuentes, las cuales se han descrito en la mayoría de los insectos estudiados. Estas respuestas incluyen la fagocitosis, nodulación, encapsulación y melanización. Estos procesos comparten elementos comunes en términos de reconocimiento de patógenos, señales bioquímicas, y la depuración final del microorganismo invasor de la hemolinfa (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Strand, 2008; Marmaras y Lampropoulou, 2009; Rosales, 2011).

La fagocitosis se refiere al reconocimiento, inmersión y destrucción intracelular de los patógenos invasores y células apoptóticas por hemocitos individuales. En los lepidópteros, la fagocitosis se logra principalmente por los plasmotocitos circulantes en la hemolinfa (Lavine y Strand, 2002; Lamprou *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009).

La nodulación es la respuesta celular de los insectos a grandes infecciones bacterianas. Se compone de la formación de agregados multicelulares de hemocitos que atrapan grandes cantidades de bacterias (Marmaras y Lampropoulou, 2009).

La encapsulación es la respuesta de los hemocitos a objetivos grandes, como parásitos, protozoos y nemátodos. Los hemocitos se unen al organismo invasor en múltiples capas de células hasta formar una cápsula alrededor de él. Dentro de la cápsula el organismo invasor es asesinado por productos citotóxicos o por asfixia (Carton *et al.*, 2009; Nappi *et al.*, 2009).

La melanización es el proceso de formación de melanina. Se activa durante la cicatrización de una herida, también en los procesos de nodulación y encapsulación contra grandes patógenos o parásitos. La enzima fenoloxidasa (PO), presente en los oenocitoides, es clave en este proceso (Lavine y Strand, 2002; Kanost *et al.*, 2004; Nappi *et al.*, 2009).

Las respuestas inmunes mencionadas se inician por moléculas de reconocimiento de patrones, las cuales permiten a los insectos distinguir entre constituyentes propios y extraños. Estudios han identificado receptores específicos de reconocimiento de patrones que responden a componentes presentes en los microorganismos tales como peptidoglicanos y lipopolisacáridos que, son los principales compuestos de las paredes celulares de bacterias y hongos (Dziarski, 2004). Entre estos receptores se encuentran las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRPs), descritas en varias especies de insectos, las cuales activan la cascada de melanización sobre los microorganismos invasores. Existen PGRPs específicas para bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos en la hemolinfa de los insectos. Una vez reconocidos los patógenos, se activan dos vías de señalización; la vía *Toll* es activada por microorganismos Gram-positivos y hongos, mientras que, la vía *Imd* se activa por microorganismos Gram-negativos (Rolff y Reynolds, 2010). Estas vías de señalización conducen a la activación de la inmunidad celular y de los péptidos antimicrobianos a través de moléculas finales *Dif* and *Relish* en el núcleo de los hemocitos (Liehl *et al.*, 2006).

2.4.3. Efecto de los insecticidas botánicos en el sistema inmunológico de los insectos

En el Manejo Integrado de Plagas (MIP) al igual que en el Manejo Agroecológico de Plagas (MAP) se han utilizado tácticas combinadas para obtener resultados más eficientes en el control de insectos considerando el menor daño al ambiente. Muchos estudios se han dedicado a encontrar el efecto combinado entre los insecticidas, especialmente de materiales botánicos, y agentes microbianos

sobre insectos plaga. Los resultados revelan que los compuestos botánicos disminuyen la capacidad inmune de los insectos contra los agentes microbianos (Zibae, 2011; James y Xu, 2012).

Existen algunos informes sobre los efectos de los productos vegetales en los hemocitos de insectos como *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) (Qadri y Narsaiah, 1978), *Dysdercus koenigii* (Hemiptera: Pyrrhoeridae) (Tikku *et al.*, 1992), *Cyrtacanthacris tatarica* (Orthoptera: Acrididae) (Peter y Ananthkrishnan, 1995) y *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (Sharma *et al.*, 2001, 2003, 2008). Sharma *et al.* (2003) observaron la vacuolización en el citoplasma y la degeneración de los orgánulos, tanto en plasmocitos como en granulocitos de larvas de *S. litura* tratados con Neem Gold (producto comercial a base de extractos de neem). Sharma *et al.* (2008) encontraron pérdida de proyecciones citoplasmáticas en granulocitos de larvas de *S. litura* tratadas con aceites de *Artemisia calamus*.

Zibae y Bandani (2010) reportaron que los extractos de *Artemisia annua* alteraron el número de hemocitos y su actividad fagocítica en *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). Indicaron también que el efecto tóxico sobre las células inmunes redujo el número de hemocitos unidos a las esporas de los hongos utilizados para este bioensayo. La unión de las esporas en la superficie de los hemocitos es un requisito esencial para la activación de la fagocitosis, lo que sugiere que la actividad celular o el reconocimiento de esporas por los receptores de los hemocitos de los insectos tratados pudieron verse afectados.

Zibae y Bandani (2010) demostraron también que los extractos de *A. annua* tienen efectos negativos en la formación de nódulos y en la actividad de la fenoloxidasas (PO) de *E. integriceps*. La PO activa cataliza la formación de quinonas, que sufre reacciones adicionales para formar melanina (Gorman *et al.*, 2007). Después de tratar a los insectos con los extractos, la PO mostró una inhibición de su actividad enzimática. Lo anterior debido, tal vez, a la unión del extracto de la planta a la enzima afectando la unión de esta al sustrato. Aunque es posible también que la inhibición resulte de un efecto alostérico, donde el inhibidor se une a un sitio diferente en la enzima cambiando la conformación (la estructura terciaria) de la enzima de manera que se reduce la afinidad del sustrato por el sitio activo (Zibae *et al.*, 2011).

Por lo tanto, los extractos de plantas en niveles subletales podrían ser suficientes para interferir con la función de los receptores específicos en el complejo sistema inmune de los insectos, o causar alteración ultraestructural que dificulte la función normal de los hemocitos (Vey *et al.*, 2002; Zibae, 2011).

2.5. *Spodoptera exigua* Hübner

2.5.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica del gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) es la siguiente:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctuidae

Género: *Spodoptera*

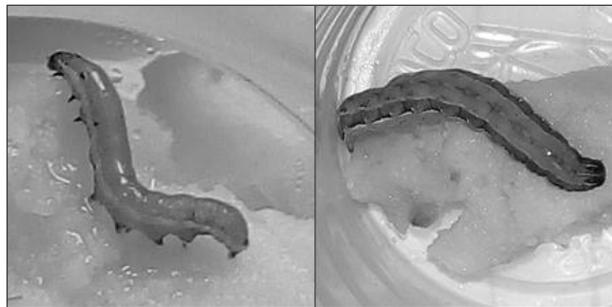


Figura 4. Larvas de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

2.5.2. Distribución, plantas hospedantes y daños

El gusano soldado es originario del Sureste de Asia, tiene una distribución mundial, se le ha reportado en África, Sur de Europa, India, Sur de Asia, Japón, Australia, Estados Unidos, Canadá, México, Centro y Sur América (Mau y Martin, 2007).

En México la distribución de *S. exigua* abarca gran parte del país, debido a que es un insecto polífago, siempre habrá alimento para continuar su desarrollo. Existen numerosos reportes de su presencia y ataque; entre los estados afectados destacan el Estado de México, Puebla, Querétaro, Hidalgo, Aguascalientes, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Durango, Zacatecas, Morelos, Guerrero, Tlaxcala, Veracruz y ocasionalmente Sonora, Sinaloa y Tamaulipas (SENASICA-SAGARPA, 2015).

Es en la etapa larval cuando los insectos de *S. exigua* causan daños a los vegetales hospederos. Como todo insecto generalista, se alimenta y se desarrolla en una gran variedad de cultivos, atacando hojas y tallos primordialmente; sin embargo, también puede atacar raíces. Afecta aproximadamente a 130 cultivos hortícolas de 30 familias diferentes (Merkx-Jacques *et al.*, 2008; Saeed *et al.*, 2009).

Entre las plantas cultivadas que ataca se encuentran algodón, frijol, maíz, sorgo, soya, brócoli, col, coliflor, lechuga, espinaca, zanahoria, remolacha, camote, papa, papaya, fresa, menta, salvia, peral, manzano, vid, berenjena, cebolla, chile, jitomate, rosas, clavel y crisantemo. Además, ha sido colectado en arvenses y malezas de las familias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cruciferae, Euphorbiaceae, Gramineae (Mau y Martín, 2007; Pérez *et al.*, 2007; SENASICA-SAGARPA, 2015).

Entre los daños ocasionados en cultivos está la disminución de superficie foliar debido a la alimentación de los estados larvales de las hojas, así como daños en frutos al realizar perforaciones en los mismos, lo cual provoca baja calidad y producción del fruto (Capinera, 2005; Garza y Terán, 2007).

2.5.3. Descripción y ciclo de vida

El gusano soldado presenta cuatro fases de desarrollo conocidas como: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos se encuentran en masas de 50 a 150 sobre las hojas, son de color verde olivo, cubiertos con una capa de escamas aterciopeladas de color gris. Las larvas pasan por cinco estadios, éstas se encuentran desprovistas de pelos durante toda esta etapa. Al iniciar su desarrollo son de color verde claro con la cabeza negra, se encuentran en grupos, y están cubiertas por una pequeña tela de seda. En el transcurso de su desarrollo se tornan de color verde oscuro en diversas tonalidades, con líneas subdorsales más o menos oscuras marcadas en cada uno de los segmentos abdominales; usualmente presentan cinco líneas blancas angostas interrumpidas en cada lado del dorso y una línea gris oscura, una línea blanca continua subdorsal y otra junto a los espiráculos. Cerca de los espiráculos se encuentran manchas blancas o amarillo brillante. El vientre es verde brillante y moteado con líneas blancas irregulares. Casi al final del quinto instar las larvas reducen su longitud entrando al estado de pupa. La pupa es de color café brillante, se le encuentra en el suelo a una profundidad de 1 cm aproximadamente, dentro de una celda elaborada con partículas de tierra. El adulto es una palomilla de color café grisáceo y brillante, mide 2.5 centímetros con las alas extendidas. Las alas anteriores son de color café grisáceo, con líneas café oscuro y escamas blancas, con una mancha redonda color crema con el centro anaranjado; las alas posteriores son blancas con las venas y el margen color café (Capinera, 2005; Garza y Terán, 2007).

Su ciclo biológico inicia cuando los huevecillos son depositados por la hembra cubriéndolos con escamas de su cuerpo, lo que limita la acción de los parasitoídes. El primer instar se alimenta en grupos por debajo de una telaraña de seda en el envés de las hojas que quedan esqueletonizadas;

el siguiente instar hace perforaciones irregulares en el follaje y hasta el tercer o cuarto instar se alimentan de los frutos. La larva pasa por 5 o 6 instares, para después dirigirse al suelo donde se convierte en pupa, de la cual emergen el adulto para completar el ciclo, en aproximadamente 30 días (Garza y Terán, 2007).

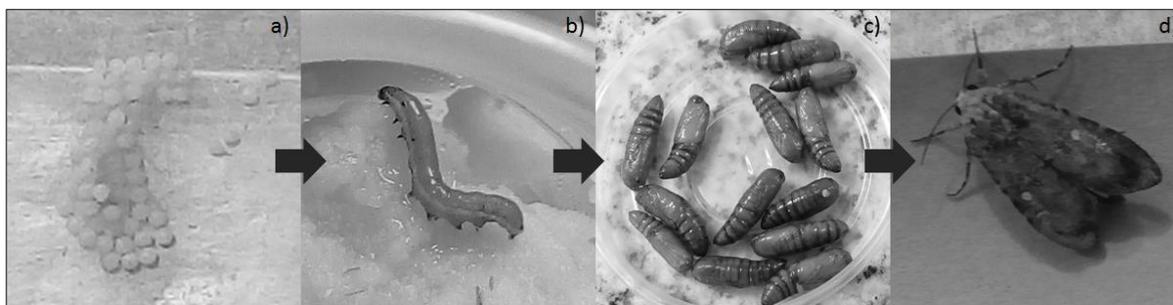


Figura 5. Ciclo de vida del gusano soldado *Spodoptera exigua*. a) Masa de huevecillos. b) Larva. c) Pupas. d) Adulto.

2.5.4. Manejo

Existen diversos métodos para lograr controlar las poblaciones de gusano soldado; sin embargo, es un hecho que el principal método se relaciona con la utilización de insecticidas sintéticos, los cuales en general son aplicados sin medida dentro de los cultivos (Garza y Terán, 2007; Meagher *et al.*, 2008).

A continuación, se describen brevemente los métodos de manejo más conocidos contra *S. exigua*:

- Control cultural. La adopción de ciertas prácticas es de gran utilidad en la reducción del impacto de esta plaga. La rotación de cultivos y propiciar policultivos en vez de monocultivos, así como la colocación de cultivos trampa o bien barreras naturales son una buena opción. También, la eliminación de arvenses y malezas dentro y en los alrededores de las parcelas y la destrucción inmediata de los residuos del cultivo después de la cosecha, son prácticas muy importantes (Mau y Martin, 2007; Garza y Terán, 2007).
- Control mecánico. Utiliza barreras o cualquier elemento que logre aislar los cultivos del ataque de los insectos, también se refiere al control realizado manualmente retirando al insecto o bien al follaje atacado. Este tipo de control es realizado en áreas pequeñas debido al tiempo y complicación que puede representar (Garza y Terán, 2007; Toledo e Infante, 2008).
- Control químico-sintético. La finalidad de su uso es el exterminio de la plaga en cuestión, sin embargo, el efecto en la realidad ha sido contrario a lo esperado. Hasta hace unas décadas

este tipo de control se realizaba asperjando los cultivos con productos como endrín o toxafeno, los cuales actualmente se encuentran prohibidos en la mayor parte del mundo, por las consecuencias que traía consigo su aplicación en el ambiente y en la salud humana. En la actualidad, y debido a los altos niveles de resistencia que ha desarrollado esta plaga, el manejo es muy difícil, por lo que es necesario el uso de productos de diferentes grupos toxicológicos y de diferente modo de acción, como es el caso de tebufenozide (regulador del crecimiento), hexaflumurón (inhibidor de la quitina), Spinosad® (activador de los receptores nicotínicos de la acetilcolina), Clorfenapyr® (impide la fosforilación oxidativa en la mitocondrias), methoxyfenozide (simulador de ecdisoma) y benzoato de emamectina (bloqueador GABA) (Garza y Terán, 2007).

- Control biológico. En este caso se busca aumentar y conservar los enemigos naturales, ya sean introducidos o nativos. Entre estos agentes de control están depredadores, parasitoides, hongos, bacterias e incluso virus. Algunos de los depredadores que atacan al gusano soldado son las chinches *Orius* sp., *Podisus* sp. y *Geocoris* sp. del Orden Hemiptera, también crisopas de la familia Chrysopidae (Neuroptera) (Giffoni *et al.*, 2007). Entre los parasitoides que atacan a *S. exigua*, sobresalen las avispas de los géneros *Chelonus*, *Cotesia* y *Meteorus* de la familia Braconidae. El llamado virus de la Poliedrosis nuclear (Nucleopolyhedrovirus) no sólo ha sido probado en el gusano soldado, sino también en otras especies de lepidópteros plaga (Lasa *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2009). Existen reportes de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* infectando a este género de insectos (Chun-xiang, 2009; García *et al.*, 2011; Freed *et al.*, 2012). Finalmente, entre las bacterias encontramos a *Bacillus thuringiensis*, que es la más popular y ampliamente probada, aunque no ha mostrado una buena efectividad en campos mexicanos (Garza y Terán, 2007).
- Control con sustancias vegetales. Se han realizado evaluaciones con productos obtenidos a partir de plantas para el manejo de *S. exigua* ya sea para conocer su efecto insectistático o insecticida; entre ellas destacan *Trichilia havanensis* y *Trichilia pallida* (Meliaceae), *Psacaliopsis purpusii* (Asteraceae), *Croton ciliatoglanduliferus* (Euphorbiaceae), *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae), *Piper auritum* (Piperaceae) y *Azadirachta indica* (Meliaceae) (Escobar *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2012).

3. Objetivos

3.1. General

Evaluar la bioeficacia insecticida e insectistática de la combinación de extractos de *Dodonea viscosa* y el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* sobre larvas de *Spodoptera exigua*, así como su efecto sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa.

3.2. Particulares

- Determinar la mortalidad en larvas de *S. exigua* tratadas con los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, de forma independiente y en combinación con conidios del hongo entomopatógeno *I. fumosoroseae*.
- Evaluar el efecto anti-alimentario provocado por los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, de manera independiente y en conjunto con los conidios de *I. fumosorosea*, sobre *S. exigua*.
- Evaluar el efecto de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, de manera independiente y en conjunto con los conidios de *I. fumosorosea*, en el desarrollo de *S. exigua*.
- Cuantificar los hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *S. exigua* al exponerlas a los extractos acetónico o metanólico de *D. viscosa*.

4. Hipótesis

La combinación del extracto de *D. viscosa* y los conidios de *I. fumosorosea* resultará significativamente diferente a los tratamientos independientes, en cuanto a su capacidad insecticida, insectistática y disminución en la cantidad de hemocitos sobre larvas *S. exigua*.

5. Materiales y Métodos

5.1. Larvas de *Spodoptera exigua*

Para establecer la cría de *S. exigua* se recolectaron, en mayo del 2016, ejemplares en cultivos de espinaca del municipio de Los Reyes, Puebla; localizado en las coordenadas 18°57' N y 97°48' O, con una altitud de 2100 msnm (INEGI, 2016). Los insectos se mantuvieron y reprodujeron, por nueve generaciones, en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Interacción Planta Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

En los experimentos se utilizaron larvas L2 o L3, colocadas individualmente en recipientes de plástico de 10 ml con tapa, a los que se les colocó 1 ml de dieta artificial (Budia *et al.*, 1994). Montado el experimento, los envases, se mantuvieron en una cámara incubadora a 27 ± 1 °C, humedad relativa de 60-70% y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad. Al montaje de cada ensayo se verificó que el peso de las larvas no fuera significativamente diferente entre los tratamientos.

5.1.1. Dieta

Cuadro 1. Ingredientes de la dieta para larvas de *Spodoptera exigua*

18.3 g	Agar bacteriológico	1.3 g	Ácido benzoico
128.3 g	Sémola de maíz	1.1 g	Nipagina
32.1 g	Germen de trigo	5 ml	Formaldehido
34.3 g	Levadura de cerveza	2.5 g	Ru Vi Otic®
4.5 g	Ácido ascórbico	1 L	Agua

La dieta se preparó incorporando, en una licuadora en marcha durante todo el proceso, el agar en ebullición con el ácido ascórbico, el ácido benzoico y la nipagina. Una vez mezclados, se agregó el germen de trigo, la levadura y la sémola de maíz. Finalmente se adicionaron el Ru Vi Otic® (vitaminas de uso veterinario) y el formaldehido. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente en un recipiente plástico limpio durante algunos minutos. Una vez gelificada, la dieta se selló herméticamente y se refrigeró.

5.2. Extractos de *Dodonaea viscosa*

El material vegetal se colectó en el mes de septiembre del 2016 en Barranca Honda, Tlaltizapán, Morelos, de coordenadas 18°49'04" N y 99°06'24" O y altitud de 1090 msnm (INEGI, 2016). De las partes aéreas de la especie *D. viscosa* se obtuvieron las hojas, las cuales fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 15 días. El material seco se pulverizó con ayuda de un molino manual Estrella®. El polvo se maceró con el disolvente (1 L de acetona o metanol por

200 g de tejido vegetal seco) a luz-oscuridad ambiental y 25 ± 3 °C, durante 72 horas. La mezcla se filtró y el disolvente fue eliminado totalmente por destilación a presión reducida con la ayuda de un evaporador rotatorio Büchi R-114, el proceso se realizó por triplicado. Los extractos se envasaron en frascos de vidrio color ámbar para evitar la fotólisis. Las emulsiones acuosas de los extractos, utilizadas en los experimentos, se prepararon adicionando agua destilada con Tween® 20 al 0.5% (v/v).

5.3. Conidios de *Isaria fumosorosea*

Se adquirió el producto comercial PAE TRON® PHC® para obtener los conidios de *Isaria fumosorosea*. El conteo de los conidios se realizó en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico. La viabilidad de los conidios se determinó antes de cada experimento, mediante la siembra del hongo en cajas de Petri con Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) incubadas durante 24 h a 26 °C. Los conidios se consideraron viables una vez que emitieron el tubo germinal (Flores *et al.*, 2013).

5.4. Aplicación tópica de los extractos de *Dodonaea viscosa*

Se aplicaron 5 µl de los extractos de *D. viscosa* con una micropipeta, a diferentes concentraciones, sobre el dorso de las larvas de *S. exigua*. Las concentraciones del extracto fueron 1250, 2500, 5000 y 10000 ppm (Seffrin *et al.*, 2010). Se implementaron dos controles negativos, “agua” y “Tween® 20 al 0.5% (v/v)”, así como un testigo positivo con el insecticida sintético Lorsban® (Clorpirifos etil) al 2% (v/v), dosis recomendada por el fabricante. Las larvas tratadas se colocaron individualmente en recipientes de plástico de 10 ml de capacidad con 1 ml de la dieta artificial y se ubicaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70% HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-oscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar; se utilizaron 25 larvas de la especie blanco por tratamiento, en los que cada larva fue una unidad experimental. Las variables respuesta fueron: peso de larvas, porcentaje de pupas, porcentaje de adultos y porcentaje de mortalidad. Los datos se registraron cada semana después de aplicados los tratamientos, durante 4 semanas.

La evaluación del efecto de los extractos acetónicos y metanólicos de *D. viscosa* aplicados de forma tópica sobre *S. exigua* se realizó en experimentos diferentes. En el bioensayo en el que se evaluó el extracto acetónico se utilizaron larvas L2, mientras que en el que se aplicó el extracto metanólico se utilizaron larvas L3.

5.5. Incorporación de los extractos de *Dodonaea viscosa* en la dieta

Los extractos, a diferentes concentraciones (Cuadro 2), se incorporaron a la dieta artificial durante la preparación de la misma (Aldana *et al.*, 2014a). Se vertió la dieta en vasos de plástico de 10 ml de capacidad, 1 ml por cada una de las 25 unidades experimentales de cada tratamiento. En cada vaso se colocó una larva L3. Los recipientes se colocaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70% HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar. Las variables respuesta fueron: peso de larvas, porcentaje de pupas, porcentaje de adultos y porcentaje de mortalidad. Los datos se registraron cada semana después de aplicados los tratamientos, durante 4 semanas.

Cuadro 2. Tratamientos incorporados en la dieta de las larvas de *Spodoptera exigua*

T1: Agua (testigo negativo)

T2: Tween® 20 al 0.5% (testigo negativo)

T3: Extracto acetónico a 500 ppm

T4: Extracto acetónico a 1000 ppm

T5: Extracto acetónico a 2000 ppm

T6: Extracto acetónico a 4000 ppm

T7: Extracto metanólico a 500 ppm

T8: Extracto metanólico a 1000 ppm

T9: Extracto metanólico a 2000 ppm

T10: Extracto metanólico a 4000 ppm

T11: Insecticida sintético Lorsban® (Clorpirifos etil) 2% v/v (testigo positivo)

5.6. Incorporación de los extractos de *Dodonaea viscosa* en la dieta para el conteo de hemocitos

Para realizar el conteo de hemocitos, los extractos de *D. viscosa*, a diferentes concentraciones (Cuadro 3), se incorporaron a la dieta artificial durante la preparación de la misma. Se vertió la dieta en vasos de plástico de 10 ml de capacidad, 1 ml por cada una de las 5 unidades experimentales de cada tratamiento. En cada vaso se colocó una larva L2. Los recipientes se colocaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70% HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar. Los datos se registraron siete días después de montado el experimento.

Además del conteo de hemocitos, en este experimento se registraron las variables: peso de larvas, porcentaje de pupas, porcentaje de adultos y porcentaje de mortalidad, utilizando los mismos tratamientos (Cuadro 3) sobre otras larvas. La dieta tratada se vertió en vasos de plástico de 10 ml de capacidad, 1 ml en cada una de las 20 unidades experimentales de cada tratamiento. En cada vaso se colocó una larva L2. Los recipientes se colocaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70%

HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar. Los datos se registraron cada semana después de montado el experimento, durante 4 semanas.

Cuadro 3. Tratamientos incorporados en la dieta de las larvas de *Spodoptera exigua* para el conteo de hemocitos

T1: Agua (testigo negativo)
T2: Tween® 20 al 0.5% (testigo negativo)
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm
T6: Extracto acetónico a 1000 ppm
T7: Extracto acetónico a 2000 ppm
T8: Extracto acetónico a 4000 ppm
T9: Insecticida sintético Lorsban® (Clorpirifos etil) 2% v/v (testigo positivo)

5.6.1. Extracción y conteo de hemocitos

Las muestras de hemolinfa se recogieron, con ayuda de una micropipeta 2-20 μl , a partir de un corte fino en una de las propatas de la larva, en el que se le colocaron 2 μl de una “solución anticoagulante” para permitir el flujo de la hemolinfa y evitar, por algunos minutos, la lisis de las células. Los hemocitos circulantes libres se determinaron por observación directa en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico (Zibae y Bandani, 2010).

La “solución anticoagulante” contenía inhibidores de proteasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1mM ácido etilendiaminotetraacético, 0.2mM Na-p-tosil-L-Lisina clorometil cetona y 1mM leupeptina) en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (100 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , pH 7.2) (Hernández *et al.*, 2015).

5.7. Incorporación de los extractos de *Dodonaea viscosa* en la dieta y aplicación del hongo *Isaria fumosorosea* sobre las larvas de *Spodoptera exigua*

Los extractos, a diferentes concentraciones (Cuadro 4), se incorporaron a la dieta artificial durante la preparación de la misma (Aldana *et al.*, 2014a). Se vertió la dieta en vasos de plástico de 10 ml de capacidad, 1 ml por cada una de las 25 unidades experimentales de cada tratamiento. En cada vaso se colocó un insecto en estadio larval L2. A las larvas de los tratamientos con el hongo *I. fumosorosea*, se les aplicaron 5 μl del patógeno en suspensión a una concentración de 1×10^9 conidios $\cdot \text{ml}^{-1}$ (García *et al.*, 2011) sobre el dorso con ayuda de una micropipeta. Los recipientes se ubicaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70% HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar. Las variables respuesta fueron: peso de larvas,

porcentaje de pupas, porcentaje de adultos y porcentaje de mortalidad. Los datos se registraron cada semana después de aplicados los tratamientos, durante 4 semanas.

Cuadro 4. Tratamientos incorporados en la dieta en combinación con la aplicación del hongo *Isaria fumosorosea* en las larvas de *Spodoptera exigua*

T1: Agua (testigo negativo)
T2: Tween® 20 al 0.5% (testigo negativo)
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm
T6: Extracto metanólico a 1000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T7: Extracto metanólico a 2000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T8: Extracto metanólico a 4000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T9: Extracto acetónico a 1000 ppm
T10: Extracto acetónico a 2000 ppm
T11: Extracto acetónico a 4000 ppm
T12: Extracto acetónico a 1000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T13: Extracto acetónico a 2000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T14: Extracto acetónico a 4000 ppm más conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T15: Conidios de <i>I. fumosorosea</i>
T16: Insecticida sintético Lorsban® (Clorpirifos etil) 2% v/v (testigo positivo)

5.8. Análisis estadístico

El análisis y el procesamiento de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico JMP® versión 8 (2008).

Se realizaron pruebas estadísticas para verificar la distribución normal (Shapiro-Wilk) y homoscedasticidad (Levinne) de los datos. Para los ensayos que cumplieron con los supuestos anteriores, la diferencia entre los tratamientos se determinó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y su comparación de medias mediante una prueba de Tukey o t-Student (Daniel, 2014).

$$\text{Modelo: } X_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

X_{ij} = es la observación de la variable respuesta que se midió

μ = la media general

T_i = efecto del tratamiento

E_{ij} : término del error

Los casos en que los datos no cumplieron con las premisas de normalidad y homocedasticidad, la diferencia entre los tratamientos se determinó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y su comparación de medias correspondiente (Daniel, 2014).

Modelo:
$$x = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

Dónde:

K = número de muestras

n_j = número de observaciones de la j -ésima muestra

n = número de observaciones en todas las muestras combinadas

R_j = suma de las jerarquías en la j -ésima muestra

6. Resultados y Discusión

6.1. Aplicación tópica de los extractos de *Dodonaea viscosa*

En el extracto acetónico se recabaron dos mediciones de la variable peso y cinco de porcentaje de mortalidad, a diferencia del extracto metanólico, en el cual se obtuvo únicamente una medición de la variable peso y cuatro de porcentaje de mortalidad; lo anterior debido al estadio de larvas utilizadas en cada experimento.

6.1.1. Actividad sobre el peso de las larvas

Al evaluar el efecto de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, aplicados de forma tópica, sobre el peso de las larvas de *S. exigua* no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y los testigos negativos; con excepción del extracto metanólico a 10000 ppm y en control "Tween® 20" (Cuadros 5 y 6).

En el experimento en donde se evaluaron los extractos acetónicos de forma tópica, el insecticida sintético Lorsban® no mostró diferencias significativas con respecto a los pesos de los otros tratamientos, incluyendo los controles. Sin embargo, el número de larvas evaluadas en este tratamiento fue menor al de los demás, debido a la alta mortalidad causada por él mismo (Cuadro 5). En el experimento en donde se evaluaron los extractos metanólicos, no se obtuvieron datos de pesos en el control positivo (insecticida Lorsban®) a causa del 100% de mortalidad provocado por el mismo tratamiento (Cuadro 6).

Cuadro 5. Actividad del extracto acetónico de *Dodonaea viscosa*, aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Peso de larvas ± DE (g)	
	5 días	12 días
T1: Agua	0.0236 ± 0.0106 ^a	0.2108 ± 0.0699 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	0.0295 ± 0.0140 ^a	0.2121 ± 0.0779 ^a
T3: Extracto a 1250 ppm	0.0269 ± 0.0087 ^a	0.2227 ± 0.0585 ^a
T4: Extracto a 2500 ppm	0.0294 ± 0.0115 ^a	0.2118 ± 0.0601 ^a
T5: Extracto a 5000 ppm	0.0259 ± 0.0089 ^a	0.1993 ± 0.0742 ^a
T6: Extracto a 10000 ppm	0.0291 ± 0.0117 ^a	0.2273 ± 0.0434 ^a
T7: Insecticida Lorsban®	0.0252 ± 0.0156 ^a	0.2238 ± 0.0712 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey)

Cuadro 6. Actividad del extracto metanólico de *Dodonaea viscosa*, aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Peso de larvas \pm DE (g)	
	6 días	
T1: Agua	0.1107	\pm 0.0512 ^{ab}
T2: Tween® 20 al 0.5%	0.1165	\pm 0.0680 ^a
T3: Extracto a 1250 ppm	0.1143	\pm 0.0516 ^a
T4: Extracto a 2500 ppm	0.0855	\pm 0.0498 ^{ab}
T5: Extracto a 5000 ppm	0.0812	\pm 0.0405 ^{ab}
T6: Extracto a 10000 ppm	0.0673	\pm 0.0322 ^b
T7: Insecticida Lorsban®		

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey)

No se encontraron trabajos en los que se hayan aplicado de forma tópica los extractos de *D. viscosa* sobre *S. exigua*, o algún otro insecto, y evaluado la variable peso. Generalmente, las investigaciones se centran en suministrar extractos o aceites esenciales sobre la dieta para evaluar el peso del insecto blanco (Aldana *et al.*, 2014a; Cárdenas *et al.*, 2015; Figueroa *et al.*, 2013; Romo *et al.*, 2016; Salinas *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2016; Zavala *et al.*, 2013). Algunos otros trabajos, evalúan el índice de preferencia (IP) como una medida indirecta del efecto anti-alimentario, tomando en cuenta la predilección del insecto entre una dieta tratada y otra sin tratar (Díaz *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

6.1.2. Actividad insecticida

Al medir el porcentaje de mortalidad, como forma de evaluar la actividad insecticida, provocada por los extractos de *D. viscosa* suministrados tópicamente, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones aplicadas y los testigos negativos (Cuadros 7 y 8).

Como era de esperarse, el control positivo “Lorsban®” resultó diferente estadísticamente a los demás tratamientos, provocando porcentajes de mortalidad del 80 y 100% en los experimentos con el extracto acetónico y metanólico respectivamente (Cuadros 7 y 8).

Si bien, tampoco se encontraron trabajos en donde se hayan aplicado extractos de *D. viscosa* de forma tópica sobre algún insecto blanco, si existen investigaciones en las que se han aplicado extractos botánicos sobre *S. exigua*.

Bullangpoti *et al.* (2011) evaluaron extractos con acetato de etilo de *Jatropha gossypifolia* sobre *S. exigua*, encontrando concentraciones letales medias (CL₅₀) de 1809 y 8644 ppm al aplicar dichos extractos sumergiendo y asperjando las larvas respectivamente.

Zhang *et al.* (2017) evaluaron la actividad por contacto de extractos de *Pinellia ternata*, utilizando solventes diferentes (metanol, etanol anhidro, acetona, éter de petróleo y acetato de etilo), encontrando rangos de mortalidad entre 17.42 y 66.44% a las 72 h de aplicados los tratamientos.

Feng *et al.* (2012) evaluaron la actividad de los extractos etanólicos de treinta plantas medicinales chinas contra *S. exigua*, aplicando 5 µg por insecto. Encontraron porcentajes de mortalidad hasta del 33.33% provocados por *Fritillaria thunbergii* y del 30% por *Brucea javanica*. Sin embargo, también observaron que extractos de *Aconitum ochranthum*, *Aristolochia mollissima* y once plantas más, no presentaron actividad toxica por contacto.

Bien es cierto que existe gran diferencia tanto biológica (familias taxonómicas) como química (metabolitos secundarios) entre las plantas mencionadas y *D. viscosa*, por lo que no habría razón para encontrar un grado de comparación entre ellas.

Cuadro 7. Actividad insecticida del extracto acetónico de *Dodonaea viscosa* aplicado de forma tópica sobre *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Mortalidad				
	Larvas		Pupas		Adultos
	5 días	12 días	19 días	27 días	33 días
T1: Agua	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^b	15 ^b
T2: Tween® 20 al 0.5%	0 ^b	0 ^c	10 ^b	10 ^b	15 ^b
T3: Extracto a 1250 ppm	0 ^b	0 ^c	5 ^b	10 ^b	20 ^b
T4: Extracto a 2500 ppm	5 ^b	10 ^{bc}	15 ^b	15 ^b	15 ^b
T5: Extracto a 5000 ppm	0 ^b	0 ^c	15 ^b	20 ^b	35 ^b
T6: Extracto a 10000 ppm	10 ^b	20 ^b	20 ^b	20 ^b	20 ^b
T7: Insecticida Lorsban®	60 ^a	65 ^a	75 ^a	75 ^a	80 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

Cuadro 8. Actividad insecticida del extracto metanólico de *Dodonaea viscosa* aplicado de forma tópica sobre *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Mortalidad			
	Larvas		Pupas	Adultos
	6 días	14 días	20 días	27 días
T1: Agua	0 ^b	5 ^b	5 ^b	5 ^b
T2: Tween® 20 al 0.5%	5 ^b	5 ^b	10 ^b	10 ^b
T3: Extracto a 1250 ppm	0 ^b	0 ^b	5 ^b	5 ^b
T4: Extracto a 2500 ppm	0 ^b	0 ^b	0 ^b	10 ^b
T5: Extracto a 5000 ppm	5 ^b	10 ^b	15 ^b	15 ^b
T6: Extracto a 10000 ppm	0 ^b	0 ^b	5 ^b	10 ^b
T7: Insecticida Lorsban®	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

6.1.3. Actividad sobre desarrollo del insecto

La actividad de los extractos de *D. viscosa* sobre el desarrollo de *S. exigua* se valoró midiendo el porcentaje de insectos que pasaron a los estados de pupa y adulto. Con el extracto acetónico no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones utilizadas y los testigos negativos, tanto en pupas como en adultos, rechazando así la hipótesis de la alteración en el desarrollo normal del insecto por estos extractos aplicados tópicamente (Cuadro 9). Con el extracto metanólico, al día 14, la concentración de 10000 ppm mostró el porcentaje más bajo de insectos pupados, resultando diferente significativamente a los controles negativos; sin embargo, esta diferencia ya no se observó a los 27 días. Al día 33, el porcentaje más bajo de insectos que llegó a la etapa adulta lo provocó la concentración de 5000 ppm, siendo diferente estadísticamente con el testigo negativo "Tween® 20" y no encontrándose diferencia significativa entre él y el control positivo "Lorsban®" (Cuadro 10).

El control positivo "Lorsban®" ocasionó los porcentajes más bajos de insectos que llegaron a convertirse en pupas y adultos, siendo diferente significativamente con todos los tratamientos del extracto acetónico. Sin embargo, no resultó diferente estadísticamente a las concentraciones de 5000 y 10000 ppm del extracto metanólico (Cuadros 9 y 10).

Igual que en los puntos anteriores, no se encontraron trabajos que permitan comparar resultados similares a lo evaluado en este experimento. Si bien, existen investigaciones en donde se han utilizado estos mismos extractos y que han medido los porcentajes pupas y adultos, la forma de aplicación difiere, por lo que se utilizarán para discusiones en puntos posteriores de este trabajo.

Cuadro 9. Actividad del extracto acetónico de *Dodonaea viscosa*, aplicado de forma tópica, en el desarrollo de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Insectos		
	Pupas		Adultos
	19 días	27 días	33 días
T1: Agua	95 ^a	95 ^a	75 ^{ab}
T2: Tween® 20 al 0.5%	85 ^a	85 ^a	75 ^{ab}
T3: Extracto a 1250 ppm	90 ^a	90 ^a	65 ^{ab}
T4: Extracto a 2500 ppm	85 ^a	85 ^a	80 ^a
T5: Extracto a 5000 ppm	80 ^a	80 ^a	50 ^b
T6: Extracto a 10000 ppm	80 ^a	80 ^a	70 ^{ab}
T7: Insecticida Lorsban®	20 ^b	25 ^b	5 ^c

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

Cuadro 10. Actividad del extracto metanólico de *Dodonaea viscosa*, aplicado de forma tópica, en el desarrollo de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Insectos		
	Pupas		Adultos
	14 días	20 días	27 días
T1: Agua	75 ^{ab}	95 ^a	35 ^{ab}
T2: Tween® 20 al 0.5%	65 ^b	85 ^a	45 ^a
T3: Extracto a 1250 ppm	95 ^a	95 ^a	40 ^a
T4: Extracto a 2500 ppm	75 ^{ab}	85 ^a	30 ^{ab}
T5: Extracto a 5000 ppm	50 ^{bc}	80 ^a	10 ^{bc}
T6: Extracto a 10000 ppm	35 ^c	80 ^a	20 ^{abc}
T7: Insecticida Lorsban®	0 ^d	0 ^b	0 ^c

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

6.2. Incorporación de los extractos de *Dodonaea viscosa* en la dieta

6.2.1. Actividad sobre el peso de las larvas

Al evaluar el efecto de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, incorporados en la dieta, sobre el peso de las larvas de *S. exigua* L3 no se encontró diferencia estadística significativa al ser comparados con los testigos negativos, por lo que se infiere que no existe una actividad anti-alimentaria (Cuadro 11).

El control positivo “Lorsban®” provocó la muerte del 100% de las larvas sometidas a dicho tratamiento, por lo que no se registró el peso de las mismas a los 7 días.

Cuadro 11. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, sobre el peso de larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Peso de larvas \pm DE (g)	
	7 días	
T1: Agua	0.2067	\pm 0.0479 ^{abc}
T2: Tween® 20 al 0.5%	0.2032	\pm 0.0447 ^{abc}
T3: Extracto acetónico a 500 ppm	0.2436	\pm 0.0425 ^a
T4: Extracto acetónico a 1000 ppm	0.2455	\pm 0.0449 ^a
T5: Extracto acetónico a 2000 ppm	0.2143	\pm 0.0444 ^{abc}
T6: Extracto acetónico a 4000 ppm	0.1776	\pm 0.0436 ^c
T7: Extracto metanólico a 500 ppm	0.2222	\pm 0.0464 ^{ab}
T8: Extracto metanólico a 1000 ppm	0.2115	\pm 0.0423 ^{abc}
T9: Extracto metanólico a 2000 ppm	0.1968	\pm 0.0409 ^{bc}
T10: Extracto metanólico a 4000 ppm	0.1888	\pm 0.0489 ^{bc}
T11: Insecticida sintético Lorsban®		

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey)

Los resultados observados contrastan con lo hallado por Aldana *et al.* (2014a), quienes encontraron diferencias significativas, a los 7 y 14 días, entre los pesos de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con extractos metanólicos de *D. viscosa*, a concentraciones de 500 y 1000 ppm, y los pesos del testigo. Lo anterior debido, tal vez, a que montaron su ensayo con insectos en estadio larval L1, etapa en que la larva es pequeña y delicada, y se mantuvo alimentándose del extracto un tiempo más prolongado.

Similar a lo hallado en este ensayo, Díaz *et al.* (2015) no encontraron actividad anti-alimentaria significativa al probar extractos etanólicos crudos de *D. viscosa* sobre *Spodoptera littoralis*. Sin embargo, esta actividad se evaluó con bioensayos de elección, ofreciendo a los insectos cuatro discos foliares de la planta hospedera, dos de ellos testigos y los restantes impregnados con 100 µg del extracto, midiendo el porcentaje de área consumida y determinando el Índice de preferencia (IP) mediante una fórmula.

6.2.2. Actividad insecticida

La actividad tóxica por ingestión de los extractos de *D. viscosa* sobre *S. exigua* se evaluó durante 3 semanas. A los siete y 14 días no se observaron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de mortalidad entre el testigo negativo “agua” y los tratamientos con extractos. Sin embargo, a los mismos días, el testigo “Tween® 20” mostró un porcentaje de mortalidad mayor en comparación con la mayoría de los tratamientos con extractos. A los 21 días se observaron diferencias significativas entre los controles negativos y todos los tratamientos del extracto acetónico, así como con el extracto metanólico a 1000 ppm. Sin embargo, las otras tres concentraciones del extracto metanólico no resultaron diferentes estadísticamente al testigo negativo “Tween® 20” (Cuadro 12).

Los extractos acetónicos mostraron porcentajes de mortalidad más altos que los metanólicos a los 21 días; sin embargo, solo dos de estos últimos resultaron significativamente diferentes al resto (2000 y 4000 ppm). Desde una perspectiva de actividad biológica, el extracto acetónico a 500 ppm resultó ser el tratamiento que presentó la actividad insecticida más alta, con un 64% de insectos muertos (Figura 7).

Sin embargo, los resultados favorables encontrados en la actividad insecticida se dan hasta la tercera semana, momento en el que la mayoría de los insectos son adultos y ya ha pasado su etapa de alto consumo fitófago.

Cuadro 12. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, sobre *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Mortalidad		
	Larvas 7 días	Pupas 14 días	Adultos 21 días
T1: Agua	0 ^c	0 ^c	4 ^e
T2: Tween® 20 al 0.5%	8 ^b	12 ^b	20 ^{de}
T3: Extracto acetónico a 500 ppm	0 ^c	0 ^c	64 ^b
T4: Extracto acetónico a 1000 ppm	0 ^c	0 ^c	56 ^{bc}
T5: Extracto acetónico a 2000 ppm	4 ^{bc}	4 ^c	56 ^{bc}
T6: Extracto acetónico a 4000 ppm	0 ^c	0 ^c	52 ^{bc}
T7: Extracto metanólico a 500 ppm	0 ^c	0 ^c	44 ^{bcd}
T8: Extracto metanólico a 1000 ppm	0 ^c	0 ^c	48 ^{bc}
T9: Extracto metanólico a 2000 ppm	4 ^{bc}	4 ^c	36 ^{cd}
T10: Extracto metanólico a 4000 ppm	0 ^c	0 ^c	36 ^{cd}
T11: Insecticida sintético Lorsban®	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

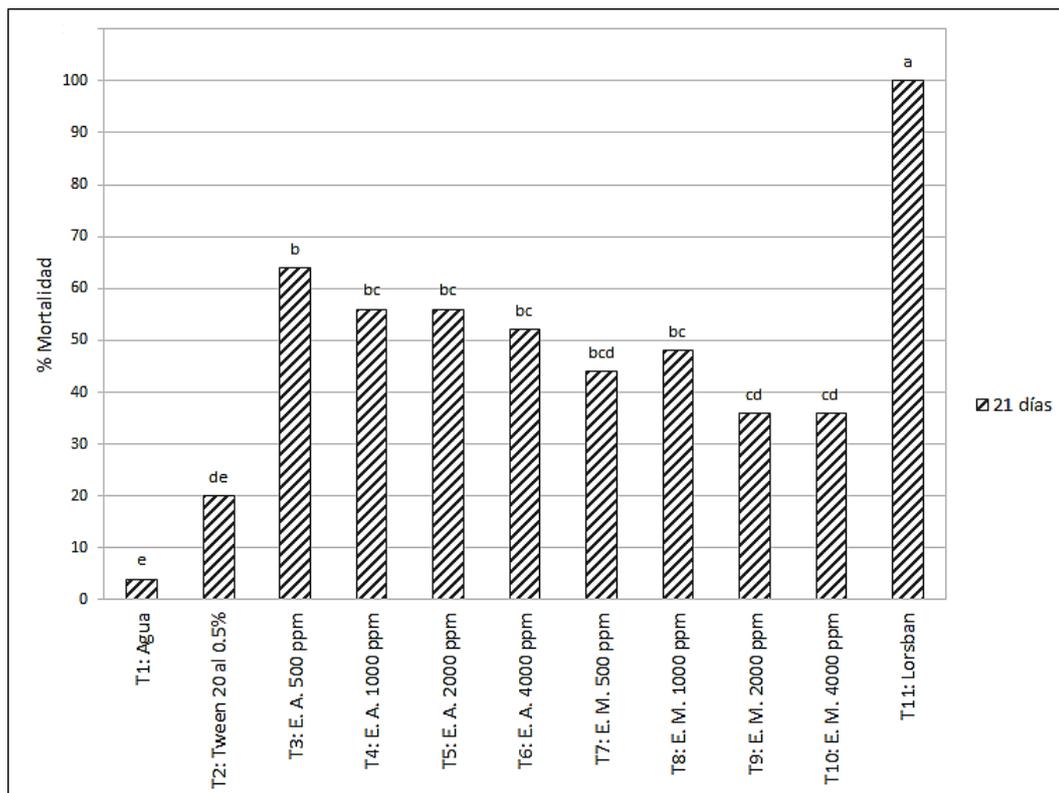


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* provocado por los extractos de *Dodonaea viscosa* a los 21 días de aplicados los tratamientos. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student).



Figura 7. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta.

Los resultados observados al día 14 contrastan con los hallados por Aldana *et al.* (2014a), quienes encontraron mortalidades en larvas de *S. frugiperda* del 32 y 28% causadas por los extractos metanólicos de *D. viscosa* a 500 y 1000 ppm respectivamente, diferentes significativamente con el grupo control. Al día 21 reportaron que la mortalidad aumentó a 61 y 66% respectivamente, siendo estos datos mayores a los encontrados en este ensayo que fueron de 44 y 48% para las mismas concentraciones del extracto metanólico. Lo anterior se puede atribuir, tal vez, a que Aldana *et al.* (2014a) utilizaron larvas L1, etapa en que la larva es aún más pequeña y delicada que las larvas L3 utilizadas en este trabajo.

Yousif y Satti (2014) evaluaron la actividad de extractos acuosos de *D. viscosa* sobre larvas de *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), plaga de granos almacenados, impregnando semillas de sorgo con concentraciones de 2.5, 5 y 10% p/v con las que fueron alimentados los insectos. Encontraron, desde las 48 h, un efecto de mortalidad significativo sobre los insectos en comparación con el testigo no tratado. Después de la primera semana, la concentración más alta sobrepasó a los otros tratamientos, induciendo una mortalidad del 100% al final de la tercera semana. Estos resultados también contrastan con lo hallado en este ensayo. Los altos porcentajes de mortalidad encontrados por Yousif y Satti (2014) pudieran estar relacionados con las concentraciones elevadas que utilizaron.

En esta investigación, como en los trabajos de Aldana *et al.* (2014a) y Yousif y Satti (2014), se observa que *D. viscosa* causa los mayores porcentajes de mortalidad sobre el insecto blanco hasta la tercera

semana de suministrados los tratamientos. Actividad insecticida poco eficiente si la comparamos con los insecticidas sintéticos (Kumar *et al.*, 2015) o con extractos de otras plantas (Feng *et al.*, 2012).

6.2.3. Actividad sobre el desarrollo del insecto

Al evaluar a los 14 días la actividad de los extractos de *D. viscosa*, incorporados en la dieta, sobre el porcentaje de pupas, se hallaron diferencias estadísticas significativas entre el testigo “agua” y la mayoría de los tratamientos con extractos, excepto con los metanólicos de mayor concentración (2000 y 4000 ppm). Sin embargo, el testigo “Tween® 20” resultó diferente estadísticamente al testigo “agua”, pero no mostró diferencias significativas con los tratamientos con extractos (Cuadro 13).

En cuanto al porcentaje de insectos que llegó a la etapa adulta al día 21, se observó que el testigo “agua” resultó diferente a todas las concentraciones del extracto acetónico, no así con los tratamientos del extracto metanólico (Cuadro 13, Figura 9).

Cuadro 13. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, en el desarrollo de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Insectos	
	Pupas 14 días	Adultos 21 días
T1: Agua	100 ^a	68 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	72 ^b	60 ^{ab}
T3: Extracto acetónico a 500 ppm	64 ^b	36 ^b
T4: Extracto acetónico a 1000 ppm	68 ^b	40 ^b
T5: Extracto acetónico a 2000 ppm	68 ^b	36 ^b
T6: Extracto acetónico a 4000 ppm	52 ^b	40 ^b
T7: Extracto metanólico a 500 ppm	52 ^b	44 ^{ab}
T8: Extracto metanólico a 1000 ppm	52 ^b	52 ^{ab}
T9: Extracto metanólico a 2000 ppm	76 ^{ab}	60 ^{ab}
T10: Extracto metanólico a 4000 ppm	76 ^{ab}	60 ^{ab}
T11: Insecticida sintético Lorsban®	0 ^c	0 ^c

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

A los 14 días, el porcentaje de pupas en el extracto metanólico a 500 y 1000 ppm fue de 52% en ambos casos (Cuadro 13), cifra menor a la reportada en el trabajo de Aldana *et al.* (2014a), de 68 y 72% respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de insectos que llegó a la etapa adulta hallado en este experimento fue de 44 y 52% a 500 y 1000 ppm respectivamente (Cuadro 13), cifras mayores a las reportadas en el trabajo de Aldana *et al.* (2014a) de 39 y 34%.

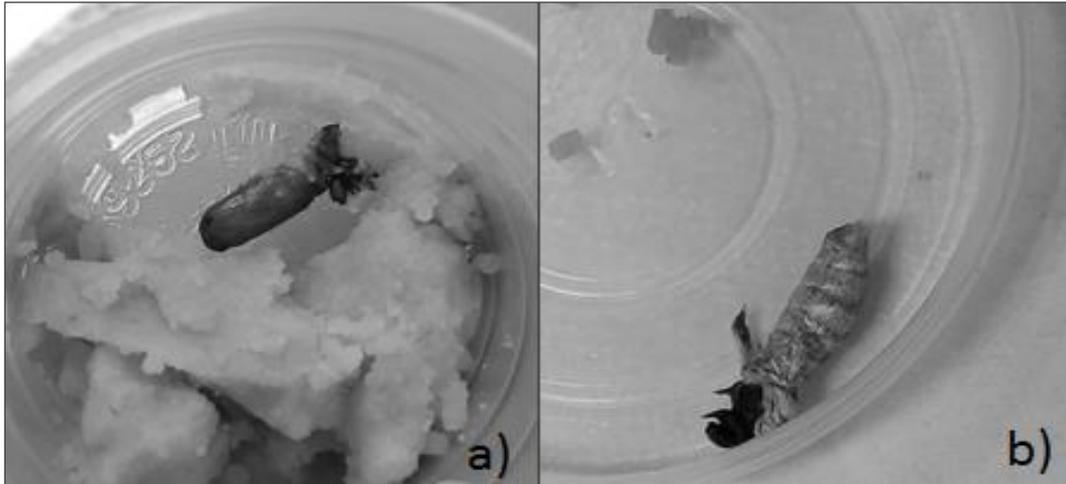


Figura 8. Pupas de *Spodoptera exigua* tratadas con los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. a) Formación normal de la pupa. b) Formación anormal, pupa muerta.

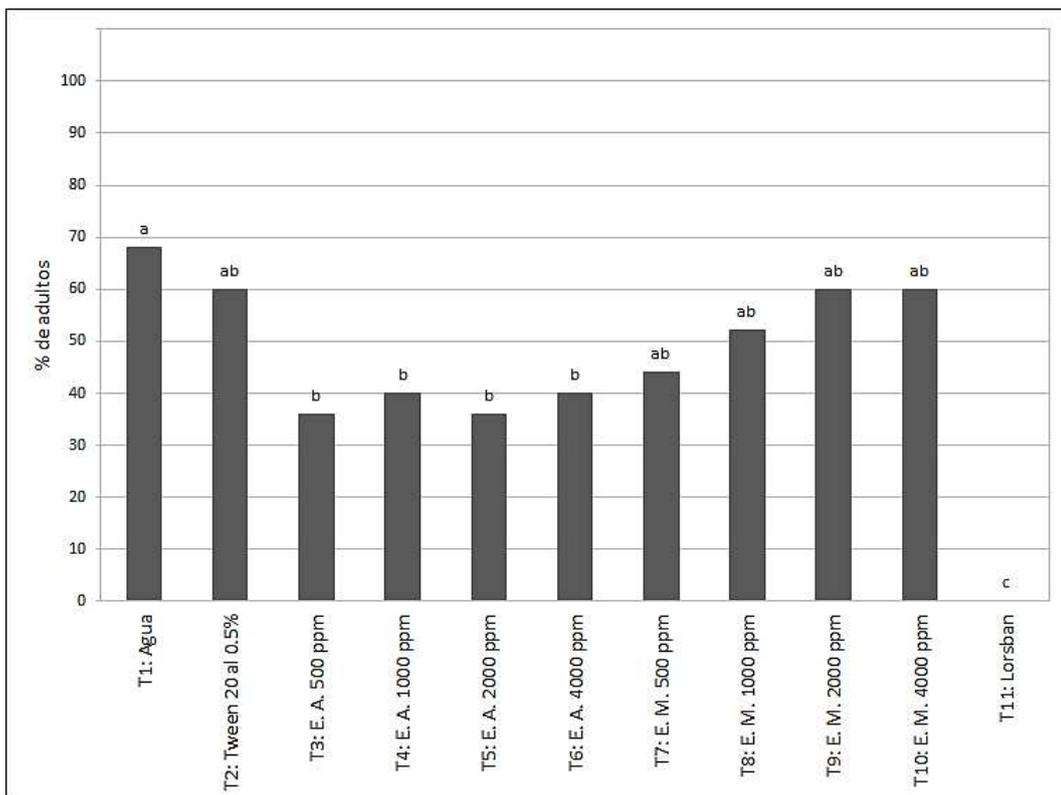


Figura 9. Porcentaje de insectos que llegaron a la etapa adulta a los 21 días de aplicados los tratamientos. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$, t-Student).

6.3. Incorporación de los extractos *Dodonaea viscosa* en la dieta para el conteo de hemocitos

Al no observarse actividad tóxica provocada por los extractos de *D. viscosa* incorporados en la dieta sobre larvas de *S. exigua* en el bioensayo anterior, se montó un segundo experimento para evaluar si los extractos presentaban alteraciones en el número de hemocitos de este insecto. Lo anterior, teniendo en cuenta los trabajos de ciertos autores que afirman que los extractos de plantas en niveles subletales (no tóxicos) son suficientes para interferir con la inmunidad celular de insectos, específicamente con la cantidad y función normal de los hemocitos (Sharma *et al.*, 2008; Zibae, 2011; Zibae & Bandani, 2010).

6.3.1. Actividad sobre el peso de las larvas

Al evaluar la actividad de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa* sobre el peso de las larvas de *S. exigua*, no se hallaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con extractos y los testigos negativos. El control positivo "Lorsban®" provocó la muerte del 100% de las larvas sometidas a dicho tratamiento en menos de 5 días, por lo que no se registraron los pesos de las mismas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, sobre el peso de larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Peso de larvas \pm DE (g)	
	5 días	12 días
T1: Agua	0.0274 \pm 0.0131 ^a	0.2094 \pm 0.0581 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	0.0259 \pm 0.0116 ^a	0.2120 \pm 0.0537 ^a
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	0.0242 \pm 0.0149 ^a	0.1641 \pm 0.0718 ^a
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	0.0223 \pm 0.0093 ^a	0.1912 \pm 0.0714 ^a
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	0.0303 \pm 0.0188 ^a	0.1959 \pm 0.0518 ^a
T6: Extracto acetónico a 1000 ppm	0.0279 \pm 0.0150 ^a	0.1833 \pm 0.0785 ^a
T7: Extracto acetónico a 2000 ppm	0.0332 \pm 0.0183 ^a	0.1612 \pm 0.0728 ^a
T8: Extracto acetónico a 4000 ppm	0.0296 \pm 0.0176 ^a	0.1751 \pm 0.0689 ^a
T9: Insecticida sintético Lorsban®		

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey)

Los resultados anteriores contrastan con lo hallado por Aldana *et al.* (2014a), quienes encontraron diferencias significativas entre los pesos de larvas L1 de *S. frugiperda* tratadas con extractos metanólicos de *D. viscosa*, a concentraciones de 500 y 1000 ppm, y los pesos del testigo negativo.

Similar a lo hallado en este ensayo, Díaz *et al.* (2015) no encontraron actividad anti-alimentaria significativa al probar extractos etanólicos crudos de *D. viscosa* sobre *Spodoptera littoralis*. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, esta actividad se evaluó con bioensayos de elección,

ofreciendo a los insectos cuatro discos foliares de la planta hospedera, dos de ellos testigos y los restantes impregnados con 100 µg del extracto, midiendo el porcentaje de área consumida y determinando el índice de preferencia (IP) mediante una fórmula.

6.3.2. Actividad insecticida

Al evaluar la actividad tóxica por ingestión de los extractos de *D. viscosa* sobre *S. exigua*, destacó en las dos primeras semanas el extracto metanólico a 2000 ppm el cual provocó porcentajes de mortalidad superiores significativamente a los testigos negativos y los demás tratamientos. Sin embargo, en la tercera y cuarta semanas ya no se observó diferencia significativa entre este extracto y los testigos (Cuadro 15).

Al día 20, el extracto metanólico a 4000 ppm y los acetónicos a 1000 y 2000 ppm ocasionaron los porcentajes de mortalidad más altos, significativamente diferentes a los controles negativos y demás tratamientos, con excepción del testigo positivo. Al día 27, sólo los extractos acetónicos a 1000 y 2000 ppm mostraron diferencias significativas con los testigos negativos (Cuadro 15, Figura 10).

Como era de esperarse, el control positivo “Lorsban®” resultó diferente estadísticamente a los demás tratamientos, provocando el 100% de mortalidad desde antes del primer registro de datos a los 5 días de montado el experimento (Cuadro 15).

Cuadro 15. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, sobre *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Mortalidad			
	Larvas		Pupas	Adultos
	5 días	12 días	20 días	27 días
T1: Agua	0 ^c	0 ^c	4.5 ^d	4.5 ^d
T2: Tween® 20 al 0.5%	0 ^c	0 ^c	4.5 ^d	13.6 ^{cd}
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	0 ^c	0 ^c	4.5 ^d	4.5 ^d
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	4 ^b	4 ^b	13.6 ^{cd}	27.3 ^{bcd}
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	0 ^c	0 ^c	36.4 ^b	36.4 ^{bc}
T6: Extracto acetónico a 1000 ppm	0 ^c	0 ^c	31.8 ^{bc}	45.5 ^b
T7: Extracto acetónico a 2000 ppm	0 ^c	0 ^c	36.4 ^b	45.5 ^b
T8: Extracto acetónico a 4000 ppm	0 ^c	0 ^c	4.5 ^d	18.2 ^{cd}
T9: Insecticida sintético Lorsban®	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

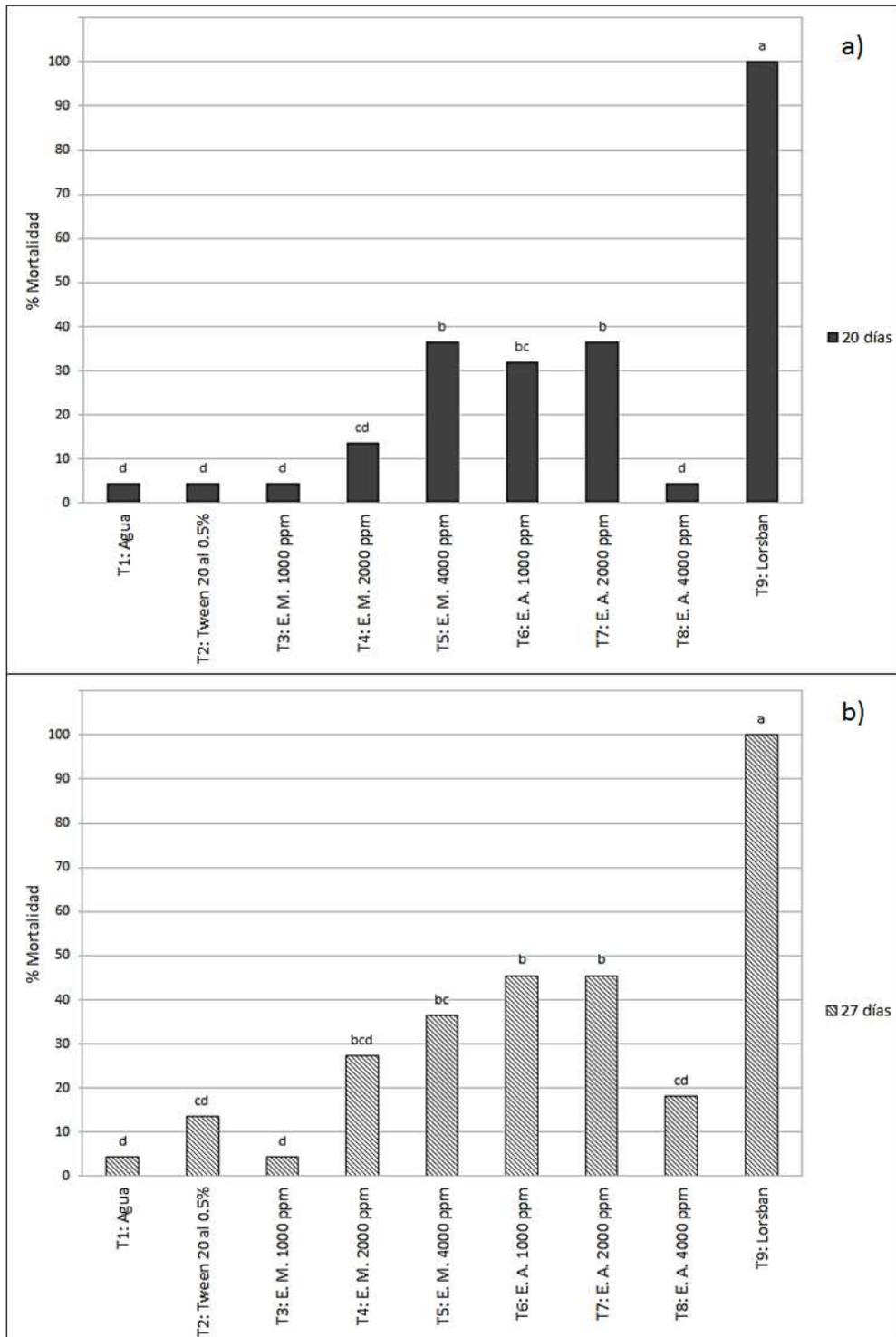


Figura 10. a) Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* provocado por los extractos de *Dodonaea viscosa* a los 20 días de aplicados los tratamientos. b) Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* provocado por los extractos de *Dodonaea viscosa* a los 27 días de aplicados los tratamientos. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student).

Similar a lo encontrado en el experimento anterior, los resultados favorables encontrados en la actividad insecticida provocados por los extractos de *D. viscosa* se dan en las etapas de pupa y adulto, momento en el cual el insecto ya no causa daño a las plantas hospedantes.



Figura 11. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta.

Los resultados obtenidos por Aldana *et al.* (2014a) contrastan con los observados en este bioensayo. A la segunda semana de montado el bioensayo encontraron mortalidades en larvas de *S. frugiperda* del 32 y 28% causadas por los extractos metanólicos de *D. viscosa* a 500 y 1000 ppm respectivamente, diferentes significativamente al grupo control. A la tercera semana reportaron que la mortalidad aumentó a 61 y 66% respectivamente, siendo estos datos mayores a los encontrados en este experimento en las semanas registradas y concentraciones del extracto metanólico. Si bien, en ambas investigaciones se trabajó con la misma especie vegetal y disolvente para obtener los extractos, las diferencias encontradas en la actividad biológica pueden deberse a las condiciones geográficas, climáticas y edafológicas de la zona de colecta, las cuales llegan a cambiar la concentración y composición de los metabolitos secundarios (Alías *et al.*, 2012; Valares, 2011).

Yousif y Satti (2014) evaluaron la actividad de extractos acuosos de *D. viscosa* sobre larvas de *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), plaga de granos almacenados, impregnando semillas de sorgo con concentraciones de 2.5, 5 y 10% p/v con las que fueron alimentados los insectos; encontrando, desde las 48 h, un efecto significativo en la mortalidad de los insectos en comparación con el testigo no tratado. Después de la primera semana, la concentración más alta sobrepasó a los otros tratamientos, induciendo significativamente una mortalidad del 100% al final de la tercera semana. Estos resultados también contrastan con lo

hallado en el presente experimento. Sin embargo, se pueden atribuir los altos porcentajes de mortalidad encontrados por Yousif y Satti (2014) a las concentraciones elevadas que utilizaron.

En esta investigación se observa que *D. viscosa* causa los porcentajes de mortalidad más altos en *S. exigua* después de la tercera semana de suministrados los tratamientos, similar a lo hallado por Aldana *et al.* (2014a). Esta actividad insecticida es poco eficiente si la comparamos con los insecticidas sintéticos (Kumar *et al.*, 2015) o con extractos de otras plantas (Feng *et al.*, 2012).

6.3.3. Actividad sobre el desarrollo del insecto

Al evaluar a los 21 días la actividad de los extractos de *D. viscosa*, incorporados en la dieta, sobre el desarrollo de *S. exigua*, se encontró que el extracto metanólico a 4000 ppm y los acetónicos a 1000 y 2000 ppm provocaron los porcentajes más bajos de insectos que llegaron a pupar, siendo diferentes significativamente a los controles negativos. A diferencia del experimento anterior, el testigo “Tween® 20” no resultó diferente estadísticamente al testigo “agua” (Cuadro 16).

Al día 27, el extracto metanólico a 2000 ppm y los acetónicos a 1000 y 2000 ppm causaron los porcentajes más bajos de insectos que llegaron a la etapa adulta, siendo diferentes significativamente a los testigos negativos (Cuadro 16).

Dado que el control positivo “Lorsban®” provocó una mortalidad del 100% desde la primera semana de montado el experimento ningún insecto de este tratamiento llegó a convertirse en pupa.

Cuadro 16. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, en el desarrollo de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Pupas 20 días	Adultos 27 días
T1: Agua	95.5 ^a	77.3 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	81.8 ^{ab}	63.6 ^{ab}
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	86.4 ^{ab}	40.9 ^{bcd}
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	68.2 ^{bc}	31.8 ^d
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	40.9 ^d	45.5 ^{bcd}
T6: Extracto acetónico a 1000 ppm	50.0 ^{cd}	31.8 ^d
T7: Extracto acetónico a 2000 ppm	45.5 ^{cd}	36.4 ^{cd}
T8: Extracto acetónico a 4000 ppm	81.8 ^{ab}	59.1 ^{abc}
T9: Insecticida sintético Lorsban®	0 ^e	0 ^e

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

El porcentaje de pupas en el extracto metanólico a 1000 ppm fue del 86%, cifra mayor a la reportada por Aldana *et al.* (2014a) del 72%. Caso similar ocurrió en el porcentaje de adultos, donde se encontró una cifra mayor (40.9%) a la reportada por ellos (34%). Lo anterior podría indicar que el extracto metanólico de *D. viscosa* a 1000 ppm utilizado por Aldana *et al.* (2014a) posee mayor actividad insectistática sobre el desarrollo de insectos del género *Spodoptera*; o bien, que la especie *S. frugiperda* es más susceptible a estos extractos que *S. exigua*. Sin embargo, se requieren más estudios para hacer una afirmación certera.

6.3.4. Actividad sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa

Al evaluar la actividad de los extractos de *D. viscosa* sobre la cantidad de hemocitos en la hemolinfa de *S. exigua*, se observó un número menor de hemocitos por mililitro en todos los tratamientos con extractos, diferentes significativamente al testigo “agua”. Sin embargo, sólo los extractos metanólicos a 1000 y 4000 ppm y el acetónico a 1000 ppm fueron diferentes estadísticamente a los dos controles negativos (Cuadro 17, Figura 13).

Cuadro 17. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, sobre la cantidad de hemocitos por mililitro en larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Hemocitos \pm DE $\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 12 días	Inhibición %
T1: Agua	10.45 \pm 1.06 ^a	
T2: Tween® 20 al 0.5%	8.90 \pm 0.82 ^{ab}	14.83
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	7.32 \pm 0.78 ^c	29.95
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	7.57 \pm 0.29 ^{bc}	27.55
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	5.56 \pm 0.23 ^d	46.79
T6: Extracto acetónico a 1000 ppm	6.52 \pm 0.61 ^{cd}	37.60
T7: Extracto acetónico a 2000 ppm	7.56 \pm 1.04 ^{bc}	27.65
T8: Extracto acetónico a 4000 ppm	7.71 \pm 0.33 ^{bc}	26.22
T9: Insecticida sintético Lorsban®		

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student).

Los datos anteriores muestran una disminución en la cantidad de hemocitos producida por los extractos utilizados, lo que coincide con lo reportado en otras investigaciones (Sharma *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2008; Zibae, 2011; Zibae & Bandani, 2010).

Sharma *et al.* (2003) evaluaron el efecto del bioinsecticida comercial Neem gold (azadiractina al 0.15%) sobre el hemograma de los hemocitos de *Spodoptera litura*. Los tratamientos se aplicaron en la dieta artificial (500, 1000 y 1500 ppm) sobre larvas del último estadio, causando una

disminución en el volumen de hemolinfa y en el recuento total de hemocitos ($\text{THC} \cdot \text{mm}^{-3}$), resultando menores significativamente al testigo a las 48 y 72 h después de ser aplicados. Los porcentajes de disminución máxima en THC registrados a las 72 h, fueron de 23.59% a 500 ppm, 46.03% a 1000 ppm y 49.95% a 1500 ppm.

Sharma *et al.* (2008) evaluaron los aceites esenciales de *Acorus calamus* por su efecto sobre los hemocitos de *Spodoptera litura*. Los tratamientos se aplicaron en la dieta artificial a 500 y 1000 ppm sobre larvas de último instar; registrándose disminuciones significativas con respecto al testigo a las 48 y 72 h de ser aplicados. Los porcentajes de disminución máxima en THC registrados a las 72 h, fueron de 29.15% a 500 ppm y 49.05% a 1000 ppm.

Similar a lo hallado por Sharma *et al.* (2003 y 2008), sin dejar de considerar que sus experimentos fueron con aceites esenciales de otra especie, en la presente investigación se encontraron porcentajes de disminución en la cantidad de hemocitos que van desde un 27.56% provocado por el extracto acetónico a 2000 ppm, hasta un 46.79% provocado por el extracto metanólico a 4000 ppm. Sin embargo, ellos encontraron dicha disminución desde las 48 h de haber aplicado los tratamientos, contrastando con lo hallado en este trabajo en que los resultados se evaluaron hasta los 12 días de someter las larvas a los extractos.

Zibae y Bandani (2010) evaluaron el efecto de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) sobre la plaga *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae) con el fin de determinar si los tratamientos a diferentes concentraciones (5, 15 y 25%) de extracto metanólico afectarían el hemograma y las reacciones inmunitarias celulares. Compararon el número total de hemocitos y midieron el porcentaje de plasmaticos y granulocitos, antes de la inoculación de las esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. No encontraron diferencias significativas entre el número total de hemocitos obtenidos de adultos alimentados con el control y los alimentados con la dieta que contenía diferentes concentraciones del extracto, excepto para el de 25%. También se observó que los porcentajes de plasmaticos y granulocitos variaban significativamente entre los grupos, de modo que, al aumentar las concentraciones, el porcentaje de los hemocitos antes mencionados, especialmente plasmaticos, disminuyeron mostrando diferencias significativas.

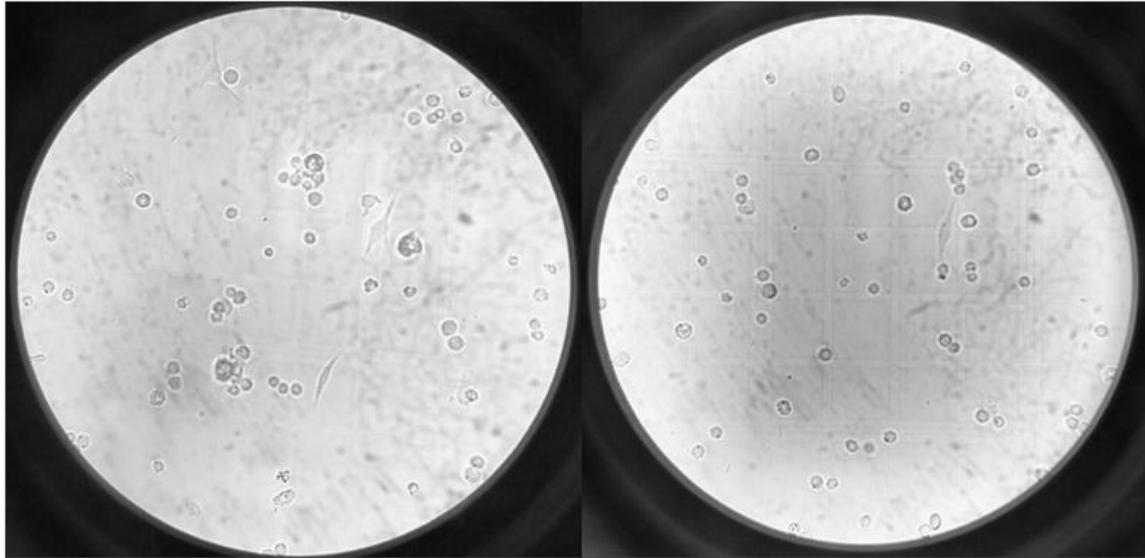


Figura 12. Imágenes al microscopio de los hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *Spodoptera exigua* tratadas con los extractos de *Dodonaea viscosa* incorporados en la dieta artificial.

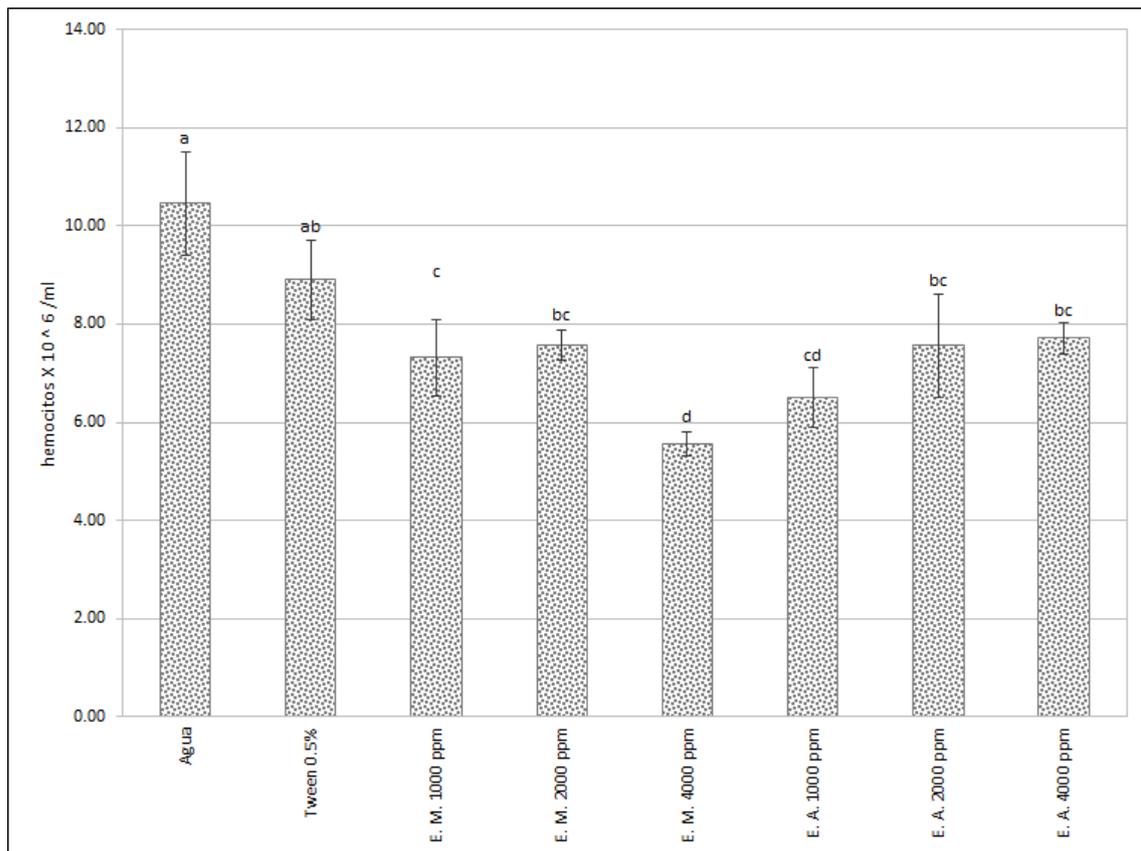


Figura 13. Cantidad de hemocitos por mililitro presentes en la hemolinfa de larvas de *Spodoptera exigua* tratadas con los extractos de *Dodonaea viscosa* sobre la dieta. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student).

6.4. Incorporación de los extractos de *Dodonaea viscosa* en la dieta y aplicación del hongo *Isaria fumosorosea* sobre las larvas de *Spodoptera exigua*

Habiendo observado la actividad de los extractos de *D. viscosa* sobre *S. exigua* en los ensayos anteriores, y confirmando las alteraciones en el número de hemocitos de este insecto, se montó este último ensayo en el que se evaluaron los mismos tratamientos en combinación con el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*, con el fin de dilucidar si esta combinación resulta más eficiente para el control de la plaga utilizada.

6.4.1. Actividad sobre el peso de las larvas

Similar a los ensayos anteriores, al evaluar la actividad de los extractos de *D. viscosa* en combinación con el hongo *I. fumosorosea* sobre el peso de larvas de *S. exigua*, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y los controles negativos, tanto a los 7 como a los 14 días (Cuadro 18).

Cuadro 18. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo *Isaria fumosorosea* aplicado de forma tópica, sobre el peso de larvas de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Peso de larvas ± DE (g)	
	7 días	14 días
T1: Agua	0.0195 ± 0.0072 ^{ab}	0.1319 ± 0.0548 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	0.0156 ± 0.0063 ^{ab}	0.1131 ± 0.0406 ^a
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	0.0155 ± 0.0041 ^{ab}	0.1084 ± 0.0261 ^a
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	0.0197 ± 0.0074 ^{ab}	0.1431 ± 0.0647 ^a
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	0.0179 ± 0.0069 ^{ab}	0.1311 ± 0.0590 ^a
T6: Extracto metanólico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0131 ± 0.0044 ^b	0.0914 ± 0.0474 ^a
T7: Extracto metanólico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0165 ± 0.0075 ^{ab}	0.1061 ± 0.0375 ^a
T8: Extracto metanólico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0183 ± 0.0088 ^{ab}	0.1195 ± 0.0546 ^a
T9: Extracto acetónico a 1000 ppm	0.0228 ± 0.0058 ^a	0.1282 ± 0.0500 ^a
T10: Extracto acetónico a 2000 ppm	0.0207 ± 0.0066 ^{ab}	0.1402 ± 0.0637 ^a
T11: Extracto acetónico a 4000 ppm	0.0196 ± 0.0047 ^{ab}	0.1191 ± 0.0370 ^a
T12: Extracto acetónico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0138 ± 0.0066 ^b	0.0812 ± 0.0192 ^a
T13: Extracto acetónico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0159 ± 0.0063 ^{ab}	0.1123 ± 0.0473 ^a
T14: Extracto acetónico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0.0129 ± 0.0037 ^b	0.081 ± 0.0187 ^a
T15: <i>I. fumosorosea</i>	0.0175 ± 0.0069 ^{ab}	0.1023 ± 0.0267 ^a
T16: Insecticida sintético Lorsban®		

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey)

Estos resultados contrastan con el trabajo de Aldana *et al.* (2014a) quienes aplicaron extractos de *D. viscosa* sobre *S. frugiperda*, encontrando diferencias significativas con el testigo. Pero Díaz *et al.* (2015) coinciden con esta investigación, al no haber hallado un efecto anti-alimentario provocado

por los extractos de *D. viscosa* sobre larvas del genero *Spodoptera*. Sin embargo, en dichas investigaciones no se aplicaron hongos entomopatógenos al evaluar esta actividad. No se encontraron reportes de investigaciones sobre el efecto anti-alimentario provocado por un extracto botánico en combinación con un entomopatógeno.

6.4.2. Actividad insecticida

La actividad tóxica por ingestión de los extractos de *D. viscosa*, solos y en combinación con el hongo *I. fumosorosea*, sobre *S. exigua* se evaluó durante 4 semanas, no encontrándose diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de mortalidad, entre los controles negativos y los tratamientos, a los siete y 14 días (Cuadro 19).

En la tercera semana los tratamientos de los extractos acetónico y metanólico en combinación con el hongo entomopatógeno mostraron porcentajes de mortalidad superiores al 40%, diferentes significativamente a los testigos negativos y a los extractos solos. Sin embargo, estos porcentajes de mortalidad no fueron diferentes estadísticamente al tratamiento en el que se aplicaron exclusivamente los conidios de *I. fumosorosea*. Los insectos muertos, todos ellos en etapa larval, presentaban una marcada proliferación de hifas del patógeno (Figura 14). Los tratamientos que contenían únicamente a los extractos no resultaron diferentes estadísticamente a los controles negativos (Cuadro 19, Figura 16).

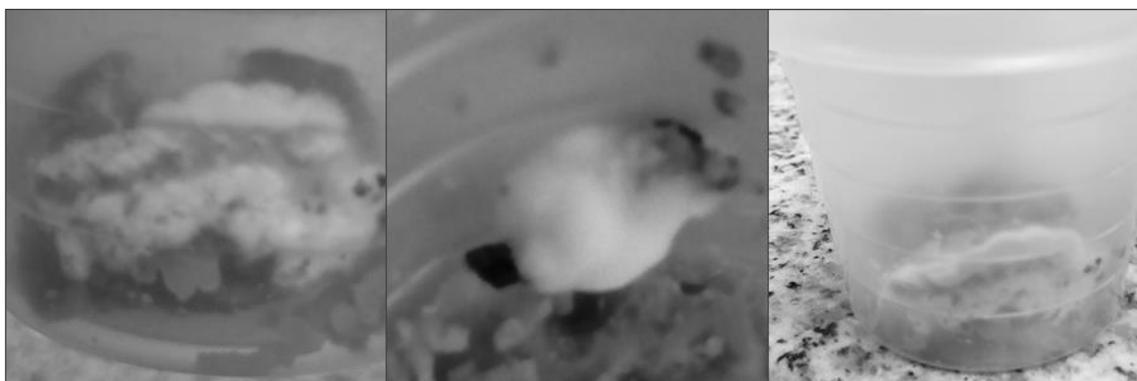


Figura 14. Larvas de *Spodoptera exigua* infectadas por el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en los tratamientos donde se aplicó en conjunto con los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta.

En la cuarta semana, el extracto metanólico a 4000 ppm y los acetónicos a 1000 y 2000 ppm aplicados en combinación con el hongo *I. fumosorosea* mostraron porcentajes de mortalidad superiores al 50%, resultando diferentes significativamente a los testigos negativos. Destaca el hecho de que no se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de mortalidad provocado

por el extracto acetónico a 1000 ppm y el causado por control positivo “Lorsban®”. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con los extractos solos y los combinados con el hongo entomopatógeno; aunque desde una perspectiva de actividad biológica, los tratamientos combinados provocaron porcentajes de mortalidad mayores a los causados por los extractos solos (Cuadro 19, Figura 16).

Cuadro 19. Actividad insecticida de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo *Isaria fumosorosea* aplicado de forma tópica sobre *Spodoptera exigua*

Tratamiento	% Mortalidad			
	Larvas		Pupas	Adultos
	7 días	14 días	21 días	28 días
T1: Agua	0 ^b	0 ^b	0 ^d	0 ^d
T2: Tween® 20 al 0.5%	0 ^b	0 ^b	8.3 ^d	16.6 ^{cd}
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	0 ^b	0 ^b	0 ^d	33.3 ^{bcd}
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	0 ^b	8.3 ^b	16.6 ^{cd}	41.6 ^{bc}
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	0 ^b	0 ^b	8.3 ^d	41.6 ^{bc}
T6: Extracto metanólico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	0 ^b	41.6 ^{bc}	50 ^{bc}
T7: Extracto metanólico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	0 ^b	41.6 ^{bc}	50 ^{bc}
T8: Extracto metanólico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	0 ^b	50 ^b	58.3 ^b
T9: Extracto acetónico a 1000 ppm	0 ^b	8.3 ^b	16.6 ^{cd}	50 ^{bc}
T10: Extracto acetónico a 2000 ppm	0 ^b	0 ^b	16.6 ^{cd}	41.6 ^{bc}
T11: Extracto acetónico a 4000 ppm	0 ^b	0 ^b	0 ^d	33.3 ^{bcd}
T12: Extracto acetónico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	8.3 ^b	58.3 ^b	66.6 ^{ab}
T13: Extracto acetónico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	8.3 ^b	50 ^b	58.3 ^b
T14: Extracto acetónico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	0 ^b	50 ^b	50 ^{bc}
T15: <i>I. fumosorosea</i>	0 ^b	0 ^b	41.6 ^{bc}	50 ^{bc}
T16: Insecticida sintético Lorsban®	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)



Figura 15. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos solos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta.

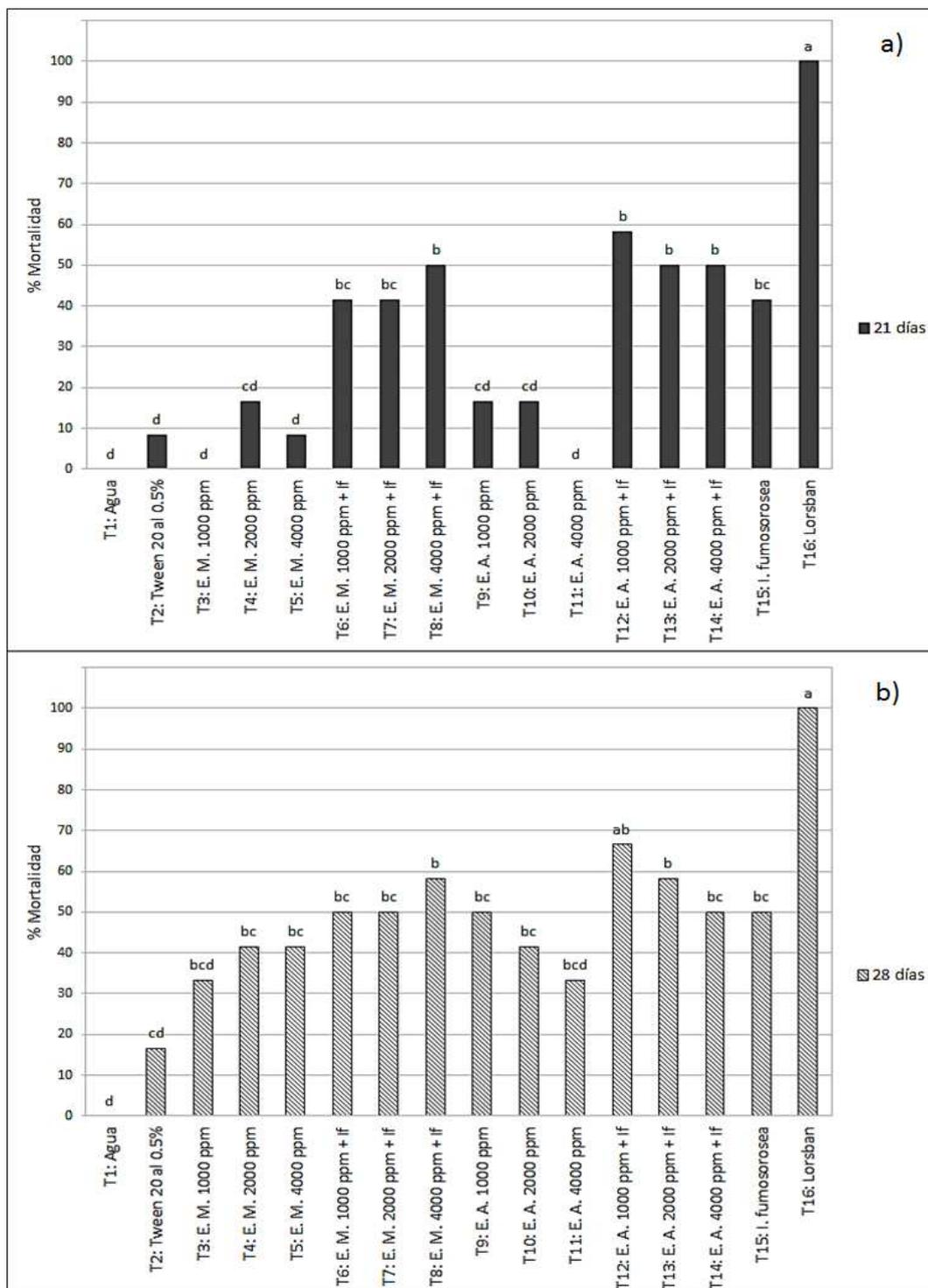


Figura 16. a) Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* provocado por los extractos de *Dodonaea viscosa* solos y en combinación con los conidios de *Isaria fumosorosea* a los 21 días de aplicados los tratamientos. b) Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* provocado por los extractos de *Dodonaea viscosa* solos y en combinación con los conidios de *Isaria fumosorosea* a los 28 días de aplicados los tratamientos. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student).

Como se esperaba, el control positivo “Lorsban®” resultó diferente estadísticamente a los demás tratamientos, provocando una mortalidad del 100% desde la primera semana (Cuadro 19).

En la tercera y cuarta semana no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos combinados y el tratamiento en el que se aplicó el entomopatógeno de forma independiente; por lo que se pudiera inferir que no existe un efecto sinérgico entre los extractos de *D. viscosa* y el hongo *I. fumosorosea*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en la cuarta semana se observó que la combinación entre el extracto acetónico a 1000 ppm y el entomopatógeno provocó un porcentaje de mortalidad igual estadísticamente al del control positivo “Lorsban®”, y superior, desde una perspectiva de actividad biológica, a los porcentajes causados por el extracto solo a la misma concentración y por el hongo aplicado de forma independiente.

Los resultados favorables en la actividad insecticida se encontraron hasta la tercera semana, coincidiendo con lo hallado en los experimentos anteriores. Sin embargo, la mortalidad provocada por los tratamientos combinados se dio en la etapa larval, impidiendo que los insectos continuaran alimentándose; a diferencia de lo observado anteriormente, donde los porcentajes de mortalidad más altos se dieron en pupas y adultos.

Al día 14 los porcentajes de mortalidad provocados por los extractos aplicados de forma independiente fueron menores a los hallados en el trabajo de Aldana *et al.* (2014a), quienes encontraron mortalidades en larvas de *S. frugiperda* del 32 y 28% causadas por los extractos metanólicos de *D. viscosa* a 500 y 1000 ppm respectivamente. Al día 21, Aldana *et al.* (2014a) reportaron porcentajes de mortalidad hasta del 66%, siendo este dato mayor a los porcentajes provocados por los tratamientos en este experimento a los mismos días.

Gandarilla *et al.* (2015) evaluaron la patogenicidad y el efecto de cuatro aislados nativos y una cepa de *I. fumosorosea* en larvas *S. exigua*, las cuales fueron inoculadas por pulverización e inmersión con suspensiones de 1×10^8 conidios por ml, encontrando porcentajes de mortalidad del 13 al 28% en larvas asperjadas y del 6 al 37% en las inmersas en la suspensión. El producto comercial utilizado en esta investigación mostró porcentajes de mortalidad mayores a los encontrados por Gandarilla *et al.* (2015) desde la tercera semana de su aplicación. Sin embargo, Hussein *et al.* (2013) quienes evaluaron la eficiencia de la nueva cepa CCM 8367 de *I. fumosorosea* en *S. littoralis*, utilizando una concentración de 5×10^7 esporas por ml, hallaron porcentajes de mortalidad superiores al 90%.

Zibae y Bandani (2010) evaluaron el efecto de *A. annua* sobre la plaga *E. integriceps* con el fin de determinar si los tratamientos a diferentes concentraciones de extracto metanólico afectarían a las reacciones inmunitarias celulares, para ello inocularon a los insectos con esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Los extractos de *A. annua* afectaron el número total de hemocitos circulantes en la hemolinfa, revelando un número reducido de hemocitos unidos a las esporas de hongos. Como consecuencia, se observó una actividad fagocítica extremadamente baja en estos grupos experimentales de bioensayo. Con base a lo anterior, se infiere que un hecho similar pudo haber ocurrido con las larvas de *S. exigua* al ser tratadas con los extractos de *D. viscosa*, por lo que a la tercera semana se disparó la mortalidad en los tratamientos combinados con *I. fumosorosea* con respecto a los tratamientos con los extractos solos.

6.4.3. Actividad sobre el desarrollo del insecto

A los 21 días, el hongo aplicado de forma independiente y los tratamientos combinados provocaron los porcentajes más bajos de insectos pupados, siendo diferentes significativamente a los controles negativos. Entre los tratamientos con extractos solos y los testigos negativos no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Se observó un efecto estadísticamente igual entre el testigo positivo "Lorsban®" y los tratamientos en los que se combinó el hongo *I. fumosorosea* con los extractos acetónicos a 1000 y 2000 ppm; sin embargo el efecto no se expresó a la concentración de 4000 ppm (Cuadro 20).

A los 27 días, en la mayoría de los tratamientos combinados el porcentaje de insectos adultos fue menor significativamente al observado en los testigos negativos, con excepción de la combinación del extracto metanólico a 2000 ppm y el hongo entomopatógeno. Los extractos acetónicos a 1000 y 2000 ppm suministrados solos también fueron diferentes significativamente a los controles negativos. El extracto acetónico a 1000 ppm y los tratamientos del hongo en combinación con los extractos acetónicos a 1000 y 2000 ppm mostraron un efecto estadísticamente igual al control positivo "Lorsban®". Sin embargo, entre los extractos solos y los combinados con el hongo, no se observaron diferencias significativas (Cuadro 20).

El porcentaje de insectos pupados en el extracto metanólico a 1000 ppm fue de 83.3%, cifra mayor a la reportada por Aldana *et al.* (2014a) de 72%. Caso similar ocurrió en el porcentaje de adultos, donde se encontró una cifra de 66.6%, contra la reportada por ellos del 34%. Sin embargo, al comparar el mismo extracto metanólico a 1000 ppm en combinación con el hongo *I. fumosorosea*, se observa que el porcentaje de insectos pupados (41.6%) es menor al reportado por Aldana *et al.*

(2014a). En el caso del porcentaje de adultos, aunque la diferencia se acortó, la cifra encontrada en esa investigación (34%), sigue siendo menor a la reportada en el presente experimento (41.6%). Lo anterior podría indicar que la combinación entre extracto metanólico de *D. viscosa* a 1000 ppm y el hongo *I fumosorosea*, posee mayor actividad insectistática sobre el desarrollo de insectos del género *Spodoptera* que los extractos suministrados de forma aislada.

Cuadro 20. Actividad de los extractos acetónico y metanólico de *Dodonaea viscosa*, incorporados en la dieta, solos y en combinación con el hongo *Isaria fumosorosea*, en el desarrollo de *Spodoptera exigua*

Tratamiento	Pupas 21 días	Adultos 27 días
T1: Agua	100 ^a	100 ^a
T2: Tween® 20 al 0.5%	91.6 ^a	83.3 ^{ab}
T3: Extracto metanólico a 1000 ppm	83.3 ^{ab}	66.6 ^{abc}
T4: Extracto metanólico a 2000 ppm	75 ^{abc}	58.3 ^{bc}
T5: Extracto metanólico a 4000 ppm	91.6 ^a	50 ^{bc}
T6: Extracto metanólico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	41.6 ^{cd}	41.6 ^c
T7: Extracto metanólico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	50 ^{bcd}	50 ^{bc}
T8: Extracto metanólico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	41.6 ^{cd}	41.6 ^c
T9: Extracto acetónico a 1000 ppm	66.6 ^{abcd}	33.3 ^{cd}
T10: Extracto acetónico a 2000 ppm	66.6 ^{abcd}	41.6 ^c
T11: Extracto acetónico a 4000 ppm	75 ^{abc}	50 ^{bc}
T12: Extracto acetónico a 1000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	33.3 ^{de}	33.3 ^{cd}
T13: Extracto acetónico a 2000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	33.3 ^{de}	33.3 ^{cd}
T14: Extracto acetónico a 4000 ppm + <i>I. fumosorosea</i>	41.6 ^{cd}	41.6 ^c
T15: <i>I. fumosorosea</i>	50 ^{bcd}	50 ^{bc}
T16: Insecticida sintético Lorsban®	0 ^e	0 ^d

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$, t-Student)

7. Conclusión

Los extractos de *D. viscosa* no presentaron un efecto significativo sobre el peso de larvas de *S. exigua*. Las larvas tratadas pasaron toda esta etapa alimentándose igual que en los controles, por lo que no se demostró un efecto anti-alimentario.

La aplicación conjunta de los extractos de *D. viscosa* y el hongo *I. fumosorosea* disminuyó significativamente el porcentaje de pupas. Sin embargo, los extractos aplicados de forma independiente no mostraron diferencias significativas a los controles negativos en la mayoría de los experimentos, con excepción del 6.3.

Los extractos acetónicos de *D. viscosa* incorporados en la dieta mostraron los porcentajes más bajos de insectos que llegaron a la etapa adulta. Sin embargo, únicamente se encontraron diferencias estadísticas significativas en los experimentos 6.3. y 6.4., en este último provocadas por la combinación con *I. fumosorosea*.

La cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa de las larvas de *S. exigua*, al exponerlas a los extractos de *D. viscosa*, disminuyó significativamente con respecto a los testigos negativos.

La actividad insecticida provocada por los extractos de *D. viscosa* incorporados en la dieta de forma independiente se presentó hasta la tercera semana, dándose en las etapas de pupas y adulto, momento en el cual los insectos ya no causan daño a las plantas hospedantes.

La aplicación conjunta de los extractos de *D. viscosa* y el hongo *I. fumosorosea* provocó porcentajes de mortalidad superiores significativamente a los controles negativos. Sin embargo, no en todos los casos resultaron estadísticamente diferentes a los extractos aplicados de forma independiente. Esta actividad insecticida se registró también en la tercera semana; sin embargo, la mortalidad se dio en la etapa larval, impidiendo que los insectos continuaran alimentándose.

Los resultados hallados en la presente investigación sugieren que los extractos de *D. viscosa* no muestran un efecto inmediato en su capacidad insecticida en el estado larval de *S. exigua*, pero si después de esta etapa, por lo que pueden causar una disminución en la población de generaciones futuras.

8. Bibliografía

- Aldana, L.L. Salinas, S.D.O. Hernández, R.M.C. y Gutiérrez, O.M. 2014a. Efecto de *Dodonea viscosa* en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Memorias del XVII Congreso Internacional De Ciencias Agrícolas*. 9 y 10 de octubre del 2014 en Mexicali, Baja California, México. Pág. 363.
- Aldana, L.L., Salinas, S.D., Gutiérrez, O.M., Valdés, E.M.E. y M.C. Hernández R. 2014b. Efecto de extractos de *Dodonea viscosa* y *Serjania schiedeana* en larvas de *Spodoptera frugiperda*. *Memorias del 2do Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria y 1er Simposio Internacional en Innovación en la Producción Agroalimentaria Sustentable*. Del 12 al 14 Mayo de 2014 en el Instituto Tecnológico de Roque, Roque, Celaya, Guanajuato. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria A.C. Pág. 187.
- Ali, S., Huang, Z. & Ren, S. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. *Journal of Pest Science*. 83: 361-370.
- Alías, J.C., Sosa, T., Valares, C., Escudero, J.C. y Chaves, N. 2012. Seasonal variation of *Cistus ladanifer* L. Diterpenes. *Plants* 1 (1): 6-15.
- Aragón, G.A., Pérez, T.B.C., Lugo, G.G.A., Damián, H.M.A., Nepomuceno, C.A.D. y López, O.J.F. 2011. Plagas insectiles y su combate con métodos alternativos a los productos químicos. En: Manejo Agroecológico de Sistemas Vol. II. Aragón, G.A., Jiménez, G.D. y Huerta, L.M. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. Pp. 174 y 175.
- Assaf, L.H.A. 2007. Ecological study and evaluation of activity of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *Paecilomyces farinosus* (Dicks ex Fr.) against the popular leaf beetle *Melasoma populi* L. (Ph.D thesis). University of Mosul, College of Agriculture and Forestry. Iraq. 231 pp.
- Auger, J. y Thibout, E. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. En: Regnault, C., Philogene, B.J.R. y Vincent, C. (Eds.). Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 337 p.
- Avery, P.B., Queeley, L.Q., Faull, J., Monique, S.J. & Simmonds, J. 2010. Effect of photoperiod and host distribution on the horizontal transmission of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales:

Cordycipitaceae) in greenhouse whitefly assessed using a novel model bioassay. *Biocontrol Science and Technology*. 20: 1097-1111.

Azcón, J. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc. Graw Hill. México. Pp. 85-95.

Bahena, J.F. 2003. Manejo agroecológico de plagas para una agricultura sostenible. En: Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable. López-Olguín, J.F. y Aragón, A. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. Pp. 149-182.

Barrientos, G.J.E. 2013. Manejo del gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) en Los Reyes de Juárez, Puebla y evaluación de la actividad de extractos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en estrategias para el desarrollo agrícola regional. Colegio de Postgraduados – Campus Puebla. Puebla. 104 p.

Beckage, N.E. 2008. Insect Immunology. Academic press. 348 pp.

Boldo, J.T., Junges, A., Amaral, K.B., Staats, C.C., Vainstein, M.H. & Schrank, A. 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics* 55: 551-560.

Bouamama, N., Vidal, C. & Fargues, J. 2010. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 105: 139–144.

Budia, F., Marco, V. y Viñuela, E. 1994. Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de *Spodoptera exigua* (Hübner). *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 20: 401-408.

Bullangpoti, V., Khumrungsee, N., Pluempanupat, W., Kainoh, Y., Saguanpong, U. 2011. Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*. 36(2): 260–263.

Bullangpoti, V., Wajnberg, E., Audant, P. & Feyereisen, R. 2012. Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. *Pest Management Science*. 68: 1255–1264.

-
-
- Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D. y Williams, T. 2009. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2): 105-115.
- Calónico-Soto, J. 2011. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Sapindaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. México. 86: 1-40.
- Cao, S., Brodie, P., Callmander, M., Randrianaivo, R., Razafitsalama, J., Rakotobe, E., Rasamison, V.E., TenDyke, K., Shen, Y., Suh, E.M. & Kingston, D.G. 2009. Antiprofelmatic triperlenoid saponins of *Dodonaea viscosa* from the Madagascar dry forest. *Journal of Natural Products*. 72: 1705-1707.
- Capinera, J.L. 2005. Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Pp. 1-3.
- Cárdenas, O.N.C., González, C.M.M., Figueroa, B.R., Flores, M.A., Romo, A.D., Martínez, G.D.E., Pérez, M.V. y Ramos, L.M.A. 2015. Composition of the Essential Oil of *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) and Its Insecticidal Activity. *Molecules*. 20: 8048-8059.
- Carton, Y., Frey, F. & Nappi, A.J. 2009. Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila paramelanica*. *Journal Parasitology*. 95(5): 1134-1141.
- Charnley, A.K. & Collins, S.A. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: 299 Kubicek, C. P., I. S. Druzhinina. Eds. *The Mycota IV: Environmental and Microbial 300 Relationships* (2nd edition). Springer-Verlag, Berlin 159-187.
- Chun-xiang, L.I. 2009. Virulence Study on Mixture of Common Pesticides with *Beauveria bassiana* against *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. 9: 095.
- Dalleau-Clouet, C., Gauthier, N., Risterucci, M., Bons, C. & Fargues, J. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Molecular Ecology Notes*. 5: 496-498.
- Daniel, W.W. 2014. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. Limusa Wiley. México. 928 p.

-
-
- De Faria, M.R. & Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237–256.
- De Negreiro, C.C.M., Carvalho, B.R.R., de Andrade, F.G., Levy, M.S., Moscardi, F. & Falleiros, M.F.A. 2009. Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. *Iheringia. Série Zoologia*. 99(1): 66-70.
- De Souza, T.W., Cruz, I., Petacci, F., De Sousa, F.S., Cola, Z.J. & Serrão, J. E. 2009. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops and Products*. 30: 384-388.
- Delgado, B.E., García, M.M., Ybarra, M.M., Luna, M.C. y Martínez, D.M. 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 18(1): 55-69.
- Dias, B.A., Neves, P.M.O.J., Maia, L.F. & Furlaneto, M.C. 2008. Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus entomopathogène *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 301-306.
- Díaz, M., Díaz, C. E., Álvarez, R. G., González, A., Castillo, L., González, C.A., Seoane, G. y Rossini, C. 2015. Differential anti-insect activity of natural products isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae). *Journal of Plant Protection Research*. 55 (2): 172-178.
- Ducrot, P.H. 2004. Contribución de la química al conocimiento de la actividad biopesticida de los productos naturales de origen vegetal. En: Regnault, C., Philogene, B.J.R. y Vincent, C. (Eds.). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 337 p.
- Dunlap, C., Jackson, M. & Wright, M. 2007. A foam formulation of *Paecilomyces fumosoroseus*, an entomopathogenic biocontrol agent. *Biocontrol Science and Technology*. 17 (5/6): 513:523.
- Dziarski, R. 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology*. 40: 877–886.

-
- EPA (United States Environmental Protection Agency). 2012. About pesticides. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.html>. Consultada en septiembre de 2015.
- Escobar, V.C., Hernández, C.B., Zayas, P.M.T., Aragón, G.A., Pérez, G.L.E., Hernández, M.R. y López, O.J.F. 2007. ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). En: Agricultura sostenible. Volumen 1; Alternativas contra plagas. Rodríguez, H.C., de Bauer, M.L.I., Valdés, L.C.G.S. y Sánchez, P.S. (Eds). Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, CP e ITA Tlaxcala. Montecillo, Texcoco, México. 109 pp.
- Esquivel, A.D., Rodríguez, R.G. y Madrigal, C.S. 2013. Evaluación de la composición química (filantósidos y lignanos) de los extractos crudos del árbol de chilillo (*Phyllanthus acuminatus* Vahl) procedente de diferentes sitios de Costa Rica. *Uniciencia*. 27: 304-318.
- Fang, W., Pei, Y. & Bidochka, M.J. 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153: 1017-1025.
- Fargues, J. & Bon, M. 2004. Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus*. Lineages on their co-infection pattern. *Journal of Invertebrate Pathology*. 87: 94-104.
- Fargues, J., Goettel, M., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L., Lomer, C. & Rougier, M. 1996. Variability in susceptibility to stimulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*. 135: 171-181.
- Feng, X., Jiang, H., Zhang, Y., He, W. & Zhang, L. 2012. Insecticidal activities of ethanol extracts from thirty Chinese medicinal plants against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(7): 1263-1267.
- Figueroa, B.R., Gutiérrez, O.M., Aldana, L.L., Valdés, E.M.E. y Hernández, R.M.C. 2006. Compuestos puros de *Carica papaya* contra *Spodoptera frugiperda*. V Congreso Internacional y XI nacional de Ciencias Ambientales. Oaxtepec, Morelos, México.
- Figueroa, B.R., Villa, A.P., López, O.J.F., Huerta, P.A., Pacheco, A.J.R. y Ramos, L.M.A. 2013. Nitrogen fertilization sources and insecticidal activity of aqueous seeds extract of *Carica papaya*

-
-
- against *Spodoptera frugiperda* in maize. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*. 40(3): 578-580.
- Flores, M.A., Pucheta, D.M., Ramos, L.M.A., Rodríguez, N.S., Ramos, E.G., Juárez, R.D. 2013. Estudio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* como control microbiológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. *Interciencia*. 38(7): 523-527.
- Freed, S., Saleem, M.A., Khan, M.B., & Naeem, M. 2012. Prevalence and effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in southern Punjab, Pakistan. *Pak J Zool*. 44: 753-758.
- Gandarilla, P.F.L., Flores, G.M.S., Morales, R.L.H., Elías, S.M., Galán, W.L.J. y Quintero, Z.I. 2015. Effect of Native Mexican Isolates of *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith on *Spodoptera exigua* (Hübner) and *Helicoverpa zea* (Boddie). *Southwestern Entomologist*. 40(4):721-729.
- García, G.C., González, M.M.B. y Bautista, M.N. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 37 (2): 217-222.
- García, G.E., García, G.P.L. & Rosales, C. 2009. An fMLP receptor is involved in activation of phagocytosis by hemocytes from specific insect species. *Developmental & Comparative Immunology*. 33: 728-739.
- García, M.R., Pérez, P.R., Rodríguez, H.C. & Soto, H.M. 2004. Toxicity of *Erythrina americana* in mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27: 297-303.
- García, N.G. y Tarango, R.S.H. 2009. Manejo biorracional del gusano cogollero en maíz. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. Campo Experimental Delicias. INIFAP. Chihuahua, México. Folleto Técnico Núm. 30. 34pp.
- Garza, U.E. y Terán, A.P. 2007. El gusano soldado *Spodoptera exigua* y su manejo en la Planicie Huasteca. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Sitio Experimental Ébano. INIFAP-CIRNE. San Luis Potosí, México. Folleto Técnico Núm. 15. 18 pp.
- Giffoni, J., Valera, N., Díaz, F. y Vázquez, C. 2007. Ciclo biológico de *C. carnea* alimentada con diferentes presas. *Bioagro*. 19(2): 109-113.

-
- Gorman, M.J., An, C. & Kanost, M.R. 2007. Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 1327–1337.
- Hernández, M.S., Rivera, P.C., Nouzova, M. & Noriega, F.G. 2015. Coordinated changes in JH biosynthesis and JH hemolymph titers in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 72: 22–27.
- Hoy, M., Raghuwinder, S. & Rogers, M. 2010. Evaluations of a Novel Isolate of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*. 93 (1): 24-32.
- Hsu, H.Y. & Chen, Y.P. 1971. Structure of Hautriwaic acid. *Phytochemistry*. 10: 2813-2814.
- Huang, S.H., Xian, J.D., Kong, S.Z., Li, Y.C., Xie, J.H., Lin, J., Chen, J.N. Wang, H.F. & Su, Z.R. 2014. Insecticidal activity of pogostone against *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*. 70: 510–516.
- Huerta, A. y Sánchez, A.C. 2012. Fundamentos del Control Biológico. Capítulo 1. En: XLVII Congreso Nacional de Entomología y Primer Congreso Latinoamericano de Acarología. Benemérita Universidad de Puebla. Puebla México. 25 pp.
- Humber, R., Hansen, K. & Wheeler, M. 2011. *Isaria* plus *Paecilomyces*, *Purpureocillium*, and *Evlachovaea*. USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF). Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80620510/ARSEFpdfs/Isaria.July2011.pdf> Consultada el 6 de octubre de 2015.
- Hunter, W.B., Avery, P.B., Pick, D. & Powell, C.A. 2011. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pests of citrus. *Fla. Entomol.* 94: 1051-1054.
- Hussein, H.M., Zemek, R., Habuštová, S.O., Prenerová, E. & Adel, M. M. 2013. Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 46(11): 1307-1319.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2016. Cartografía Geoestadística Urbana y Rural Amanzanada. En: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=17> Consultada el 10 de junio de 2016.

-
-
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. & Strasser, H. 2001. Use of *Hyphomycetous* fungi for managing insect pests, 23-69. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Butt, T.M., Jachson, C. & Magan, N. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Isman, M.B. & Akhtar, Y. 2007. Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides. In: *Insecticides Desing Using Advanced Technologies*, Shaaya, I., Nauen, R. & Horowitz, A.R. (Eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, Pp. 235-248.
- Isman, M.B. 2006. The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*. 51: 51-66.
- James, R.R. & Xu, J. 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109: 175–182
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. & Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213-236.
- Juan-Pérez, J.I. 2013. Funciones e importancia económica del recurso chapulixtle (*Dodonaea viscosa*) en un ejido del Subtrópico mexicano. *Observatorio Iberoamericano del Desarrollo Local y la Economía Social*. Año 7. No. 14. ISSN: 1988-2483.
- Kanost, M.R., Jiang, H. & Yu, X.Q. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*. 198: 97-105.
- Kim, J., Je, Y. & Roh, J. 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 37: 419-423.
- Kumar, N.N., Acharya, M.F., Srinivasulu, D.V. & Sudarshan, P. 2015. Bioefficacy of Modern Insecticides against *Spodoptera litura* Fabricius on Groundnut. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 4(3): 573-577.
- Lacey, L. & Mercadier, G. 1998. The effect of selected allelochemicals on germination of conidia and blastospores and mycelia growth of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Mycopathologia*. 142: 17-25.

-
-
- Lamprou, I., Mamali, I., Dallas, K., Fertakis, V., Lampropoulou, M. & Marmaras, V.J. 2007. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology*. 121(3): 314–27.
- Lasa, R., Ruiz, P.C., Alcázar, M.D., Belda, J.E., Caballero, P. & Williams, T. 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. *Biological Control*. 40: 89-96.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295–1309.
- Lemaitre, B. & Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 697-743.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan G. & Zhao, M. 2011. Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*. 10(86): 19864-19873.
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Bocard, F. & Lemaitre, B. 2006. Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model. *PLoS Pathog.* 2(6): e56, 0551-0561.
- Luangsa-Ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Manoch, L. & Samson, R.A. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109: 581-589.
- Marco, M.V.S. y Pérez, M.I. 2011. Manejo de plagas en agricultura orgánica: el papel clave de la estrategia de control biológico por conservación. En: Manejo Agroecológico de Sistemas Vol. II. Aragón, G.A., Jiménez, G.D. y Huerta, M.L. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. Pág. 163.
- Marmaras, V.J. & Lampropoulou, M. 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*. 21: 186-95.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Mau, R.F.L. & Martin, K.J.L. 2007. *Spodoptera exigua* (Hubner). Crop Knowledge Master. En: <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop> Consultada el 15 de febrero de 2015.

-
- McDowell, M. 2007. Australian National Botanic Gardens. En: <http://www.anbg.gov.au/gnp/interns-2007/dodonea-viscosa.html> Consultada en mayo de 2015.
- Meagher, R.L., Brambila, J. & Hung, E. 2008. Monitoring for exotic *Spodoptera* species (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida. *Florida Entomologist*. 91: 517-522.
- Merkx-Jacques, M., Despland, E. & Bede, J.C. 2008. Nutrient utilization by caterpillars of the generalist beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Physiological Entomology*. 33: 51-61.
- Moreno, G.M. 2010. El eficaz sistema inmune de los insectos. *Revista Ciencia y Desarrollo*, CONACYT. 36(239): 26-31.
- Murillo, A.W. y Salazar, D.F. 2011. Tendencias verdes en la agricultura para el manejo y control de plagas. *Revista Tumbaga*. 6: 63-92.
- Mustafa, U. & Kaur, G. 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica*. 54: 499-504.
- Nappi, A., Poirié, M. & Carton, Y. 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Advances in Parasitology*. 70: 99-121.
- Nicholls, E.C.I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 282 pp.
- Numa, V.S.J., Bustos, R.A., Rodríguez, C.D. & Cantor, R.F. 2011. Laboratory and greenhouse evaluation of the entomopathogenic fungi and garlic-pepper extract on the predatory mites, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* and their effect on the spider mite *Tetranychus urticae*. *Biological Control*. 57(2): 143-149.
- Oliveira, C.N., Neves, P.M.O.J. & Kawazoe, L.S. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Sci. Agric*. 60: 663-667.
- Pal, S., St. Leger, R.J. & Wu, P.L. 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8969-8977.

-
-
- Pedrini, N.R., Crespo, M. & Juárez, M.P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146:124-137.
- Pérez, P.F., Montes de Oca, M.M., Estévez, G.J.R. y Carnero, H.A. 2007. Una plaga potencial en los cultivos hortícolas de Canarias: *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Dpto. Protección vegetal. ICIA. La Laguna. España. 4 p.
- Peter, A.J. & Ananthakrishnan, T.N. 1995. Impact of azadirachtin on the haemodynamics of *Cyrtacanthacris tatarica* (Acrididae: Orthoptera). *J. Entomol. Res.* 19(4): 285–290.
- Qadri, S.S.H. & Narsaiah, J. 1978. Effect of azadirachtin on the moulting processes of last instar nymphs of *Periplaneta americana* (L.). *Indian J. Exp. Biol.* 16: 1141–1143.
- Quintana de Oliveira, S., Rojo de Almeida, M.T., Maraslis, F., Thais, S. I., Marques, S. T. C., Palermo, J. A., Cabrera, G. M., Soriano, B. C. M., Oliveira, S. C. M. & Schenkel, E. P. 2012. Isolation of three new ent-labdane diterpenes from *Dodonaea viscosa* Jacquin (Sapindaceae): preliminary evaluation of antiherpes activity. *Phytochemistry Letters*. 5: 500-505.
- Regnault, C., Philogene, B.J. & Vincent, C. 2004. Biopesticidas de Origen Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 337 p.
- Ribeiro, C. & Brehelin, M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is what? *Journal of Insect Physiology*. 52: 417–429.
- Rodríguez, H.C. 1993. Fitoinsecticidas en el combate de insectos. In: “Bases prácticas de la agroecología en el desarrollo centroamericano”. Módulo II: Manejo de plagas en el sistema de producción orgánica. San Martín Zapotitlan, Retalhuelu.GT. Pp. 112-125.
- Rolff, J. & Reynolds, S.E. 2010. Insect infection and immunity (evolution, Ecology and Mechanisms). Oxford university press. 254 pp.
- Romo, A.D., Ramos, L.M.A., Salinas, S.D.O., Figueroa, B.R., Vela, C.G. y Vázquez, M.B.E. 2016. Evaluación del extracto hexánico del mirto sobre el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomología mexicana*. 3: 159–164.
- Rosales, C. 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *Invertebrate Survival Journal*. 8(1): 109–131.

-
- Ruiz, C.J.A., Bravo, M.E., Ramírez, O.G., Báez, G.A.D., Álvarez, C.M., Ramos, G.J.L., Nava, C.U. y Byerly M.K.F. 2013. Plagas de Importancia Económica en México: Aspectos de su biología y ecología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Libro Técnico Núm. 2
- Rzedowski, G.C. y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rzedowski, J. y Calderón, G. 2006. Sapindaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 142.
- Sachdev, K. & Kulshreshtha, D.K. 1983. Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Phytochemistry*. 22: 1253-1256.
- Sachdev, K. & Kulshreshtha, D.K. 1986. Viscosol, a C3' prenylated flavonoid from *Dodonaea viscosa*. *Phytochemistry*. 25: 1967-1969.
- Saeed, S., Sayyed, A.H. & Ahmad, I. 2009. Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Pest Science*. 83: 165-172.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Ficha técnica 11. Manejo Integrado de Plagas. En: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Manejo%20integrado%20de%20plagas.pdf> Consultada el 20 de febrero de 2015.
- Sahayaraj, K., Karthick, R.N.S. & Martin, R.J. 2011. Compatibility of entomopathogenic fungi with extracts of plants and commercial botanicals. *African Journal of Biotechnology*. 10(6): 933-938.
- Salinas, S.D.O., Aldana, L.L., Valdés, E.M.E., Gutiérrez, O.M., Valladares, C.G. y Rodríguez, F.E. 2012. Insecticidal Activity of *Tagetes erecta* Extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 95(2): 428-432.
- Sánchez, Ll. de C., Rodríguez, S., Barranco, J.E., Chávez, E. & López, M.A. 2013. Extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana*, una alternativa para el control de *Metamasius spinolae*

-
- (GYLLENGAL BUSK), bajo condiciones de laboratorio. *Entomología mexicana* 12 (1): 273-279.
- Sánchez, M., Vázquez, R.L.M., Bahena, J.F., y Fregoso, L.E.T. 2007. El Manejo Agroecológico de Plagas en el contexto de la agricultura sostenible. En: Avances en Agroecología y Ambiente Vol. I. López-Olguín, J.F., Aragón, G.A. y Tapia, R.A. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. Pp.277-295.
- Seffrin, R., Shikano, I., Akhtar, Y. & Isman, M. B. 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*. 29(1): 20-24.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2008. Insectos Fitófagos y Enfermedades Asociadas al Maíz en México. En: http://www.sisi.org.mx/jsp/si/documentos/2008/seguimiento/08210/0821000001508_065.doc Consultada en septiembre de 2015.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2015. Colección de hongos entomopatógenos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. En: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=6033> Consultada el 21 de junio de 2015.
- SENASICA-SAGARPA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Programa de Trabajo de la Campaña Manejo Fitosanitario del maíz a operar con recursos del componente Sanidad e Inocuidad del Programa Soporte 2015. Gobierno del Estado de Michoacán. Pp. 7-8.
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A. & Husnain, T. 2012. Entomopathogenic Fungi as Biological Controllers: New Insights into their Virulence and Pathogenicity. *Archives Biological Sciences* 1: 21-42.
- Sharma, P.R., Sharma, O.P. & Saxena, B.P. 2001. Ultrastructure of the haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera; Noctuidae). *Biol. Bratislava*. 56(3): 277-285.

-
-
- Sharma, P.R., Sharma, O.P. & Saxena, B.P. 2003. Effect of neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera; Noctuidae). *Curr. Sci.* 84(5): 690-695.
- Sharma, P.R., Sharma, O.P. & Saxena, B.P. 2008. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Micron.* 39: 544–551.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J.C., Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología.* 66: 4-12.
- Sirajuddin, N.T. & Anggraeni, T. 2014. The effect of leaf biopesticide (*Mirabilis jalapa*) and entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*) combinations to some physiological characters and histology of *Crociodolomia pavonana* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. In *4TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES (ICMNS 2012): Science for Health, Food and Sustainable Energy* (Vol. 1589, pp. 308-311). AIP Publishing.
- Srisukcha, Y., Wiwat, P.C. and Pantuwatana, S. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Science Asia* 31: 273-276.
- Stanley, D.W. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological significance. *Annual Review of Entomology.* 51: 25–44.
- Strand, M.R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science.* 15: 1-14.
- Strand, M.R., Beck, M.H. & Lavine, M.D. 2006. *Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 61, 134–145.
- Téllez, J.A., Cruz, M.G., Mercado, A. y Asaff, A.A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología.* 30: 73-80.
- Tikku, K., Saxena, B.P., Satti, N.K. & Suri, K.A. 1992. Plumbagin-induced ultrastructural haemocytic response of *Dysdercus koenigii* (F.). *Insect Sci. Appl.* 13(6): 787–791.
- Toledo, J. e Infante, F. 2008. Manejo Integrado de Plagas. Editorial Trillas. 327 pp.

-
- Ulrichs, C., Mewis, I. & Adhikary, S. 2008. Antifeedant activity and toxicity of leaf extracts from *Porteresia coarctata* Takeoka and their effects on the physiology of *Spodoptera litura* (F). *Journal of Pesticide Science*. 81: 79-84.
- Valdés, E.M.E., Aldana, L.L., Salinas, S.D.O., Figueroa, B.R., Hernández, R.M.C. y Valladares, C.M.G. 2016. Toxicity of Plant Extracts to *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*. 99(2): 226-230.
- Valares, M. C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Extremadura. 216 pp.
- Van Driesche, R., Hoddle, M. & Center, T. 2008. Control of Pests and Weeds by Natural Enemies: An Introduction to Biological Control. Blackwell, Malden, MA, USA. 473 pp.
- Vey, A., Matha, V. & Dumas, C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*. 80:177–187.
- Villegas, M.T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigaciones en Biotecnología Aplicada, CIBA-INP Tlaxcala. 98 p.
- Wang, C.S. & St. Leger, R.J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell*. 6: 808–816.
- Wang, C.S., Duan, Z.B., & St. Leger, R.J. 2008. The MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell*. 7: 302–309.
- Wessels, J.G.H. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetic Biology*. 27: 134-145.
- Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 147 p.

-
- Ybarra, M.I., Popich, S., Bokorsky, S.A., Asakawa, Y. & Bardon, A. 2005. Manoyl oxide diterpenoides from *Grindelia scorzonerifolia*. *Journal Natural Products*. 68: 554-558.
- Yokoyama, E., Arakawa, M., Yamagishi, K. & Hara, A. 2006. Phylogenetic and Structural analyses of the mating type loci in *Clavipitaceae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter*. 264: 182-191.
- Yousif, E.A.A. & Satti, A.A. 2014. Evaluation of Water Extracts from Seven Sudanese Plants as Natural Insecticides. *International Journal of Science and Research*. 3(12): 1305-1310.
- Zavala, S.M.A., Pérez, G.S., Romo, A.D., Cárdenas, O.N.C. & Ramos, L.M.A. 2013. Activity of Four *Salvia* Species Against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwestern Entomologist*. 38: 67-73.
- Zhang, C. & Xia, Y. 2009. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Current Genetics*. 55: 399-407.
- Zhang, S., Wideman, E., Bernad, G., Lesot, A., Pinot, E., Pedrini, N. & Keyhani, N.O. 2012. CYP52X1, Representing next cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Biological Chemistry*. 28: 13477-13486.
- Zhang, Y. N., He, P., Xue, J. P., Guoc, Q., Zhu, X. Y., Fang, L. P., Li, J. B. 2017. Insecticidal activities and biochemical properties of *Pinellia ternata* extracts against the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 20: 469–476.
- Zhao, H., Charnley, A.K., Wang, Z., Yin, Y., Li, Z., Li, Y., Cao, Y., Peng, G. & Xia, Y. 2006. Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of *Metarizium anisopliae*. *Journal Biochemistry*. 140: 319-327.
- Zibae, A. & Bandani, A.R. 2010. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on digestive enzymes profiles and cellular immune reactions of sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*. 100: 185-196.

-
- Zibae, A. 2011. Botanical insecticides and their effects on insect biochemistry and immunity. In: Stoytcheva, M. (Ed.). "Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment". *Publisher: InTech*. Pp: 55-68.
- Zibae, A., Bandani, A.R. & Malagoli, D. 2011. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 158: 117-123.
- Zimmerman, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosa*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology, and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 18(9): 865-901.
- Zoubiri, S. & Baaliouamer, A. 2014. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*. 18(6): 925-938.

9. Anexos

9.1. Información de las fotografías originales incluidas en este documento

Figura 1b. Imagen al microscopio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*. Fotografía tomada el 28 de octubre de 2016 en el Laboratorio de Fitopatología de la UAM-Xochimilco.



Figura 2. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. Fotografías tomadas el 18 de octubre de 2015 en Yautepec, Morelos.



Figura 4. Larvas de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Fotografías tomadas el 15 de noviembre de 2016 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

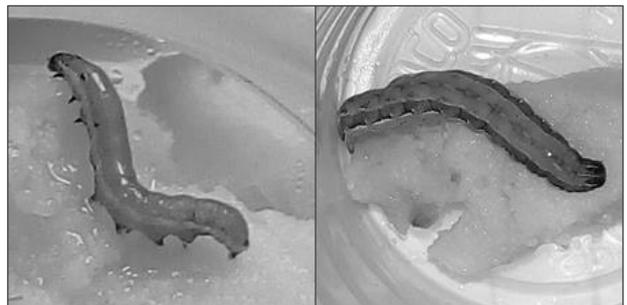


Figura 5. Ciclo de vida del gusano soldado *Spodoptera exigua*. a) Masa de huevecillos. b) Larva. c) Pupas. d) Adulto. Fotografías tomadas en noviembre de 2016 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

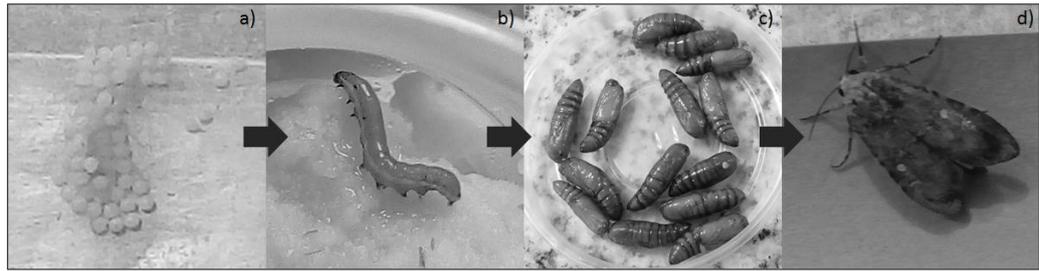


Figura 6. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. Fotografías tomadas el 21 de diciembre de 2016 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.



Figura 8. Pupas de *Spodoptera exigua* tratadas con los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. a) Formación normal de la pupa. b) Formación anormal, pupa muerta. Fotografías tomadas el 28 de diciembre de 2016 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

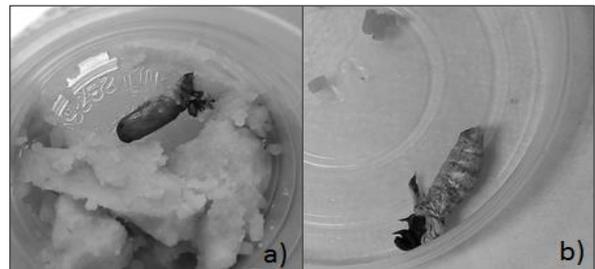


Figura 11. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. Fotografías tomadas el 17 de febrero de 2017 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.



Figura 12. Imágenes al microscopio de los hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *Spodoptera exigua* tratadas con los extractos de *Dodonaea viscosa* incorporados en la dieta artificial. Fotografías tomadas el 17 de febrero de 2017 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

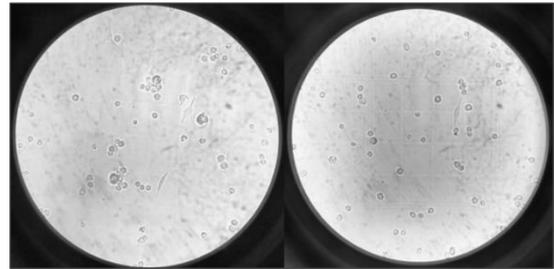


Figura 14. Larvas de *Spodoptera exigua* infectadas por el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en los tratamientos donde se aplicó en conjunto con los extractos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. Fotografías tomadas el 30 de marzo de 2017 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

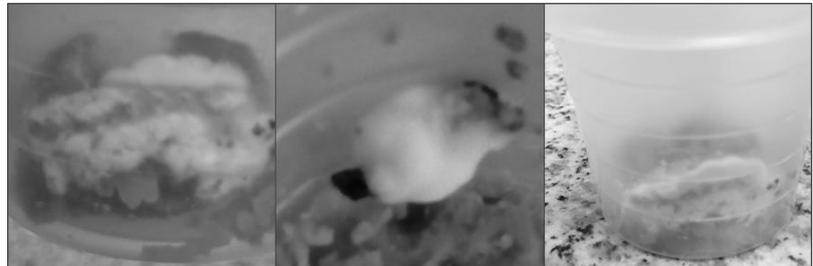


Figura 15. Larvas de *Spodoptera exigua* muertas a causa de los extractos solos de *Dodonaea viscosa* suministrados en la dieta. Fotografías tomadas el 30 de marzo de 2017 en el Laboratorio de Fitoquímica del CIByC-UAEM.

