




ARTÍCULO CIENTÍFICO

METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Raquel Salas-Monzón ¹
Oscar Eduardo Hernández-Torres ¹
J. Refugio Lomeli-Flores ¹
Rebeca Peña-Martínez ²
Ana Lilia Muñoz-Viveros ³
Juan Manuel Vanegas-Rico ¹ 

¹Posgrado en Fitosanidad, Programa de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

salas_raquel94@hotmail.com

hdz.torresoe@gmail.com

jrlf@hotmail.com

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

rebeKapena@gmail.com

³Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

munozal@unam.mx

 entomologo.mexicano@gmail.com

¹Carretera México Texcoco Km 2.5 Montecillo, C. P. 56230, Texcoco, estado de México.

²Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Santo Tomás, C. P. 11340, Ciudad de México.

³Av. de los Barrios No. 1. Los Reyes, Tlalnepantla, C. P. 54090, estado de México.

Folia Entomológica Mexicana (nueva serie), 4(3): 85–90, 2018.

Recibido: 25 de julio 2018

Aceptado: 16 de diciembre 2018

Publicado en línea: 4 de enero 2019

METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Methodology to study the development of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) under laboratory conditions

Raquel Salas-Monzón¹, Oscar Eduardo Hernández-Torres¹, J. Refugio Lomeli-Flores¹, Rebeca Peña-Martínez², Ana Lilia Muñoz-Viveros³ y Juan Manuel Vanegas-Rico^{1*}

¹Posgrado en Fitosanidad, Programa de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

³Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor de correspondencia: entomologo.mexicano@gmail.com

RESUMEN. En esta investigación se probaron cuatro arenas experimentales en condiciones de laboratorio, con el fin de establecer una metodología de confinamiento de *Melanaphis sacchari* para estudiar aspectos de su ciclo biológico. Las arenas experimentales evaluadas consistieron en: "Plántula enraizada completa" (Arena 1), "Plántula enraizada con hoja única" (Arena 2), "Caja clip" sobre plántula (Arena 3), "Caja agar-disco foliar" (Arena 4). Las variables evaluadas fueron: a) sobrevivencia de pulgones, considerando un mínimo de cinco días; b) facilidad de observación y manipulación; c) optimización del espacio en cámara de cría. Los cambios de cada estadio ninfal se basaron en la detección de la exuvia correspondiente; la madurez se reconoció por la presencia de la placa genital y el desarrollo completo de la cauda. Los resultados mostraron que *M. sacchari* requiere permanecer en el envés, situación que aunada a su movilidad dificultó el seguimiento en las arenas 1 y 2; mientras que en las arenas 3 y 4, se logró observar la presencia de ninfas abortadas. La arena experimental 4 "Caja agar-disco foliar" fue el dispositivo que cumplió con todos los criterios establecidos. Se considera que este dispositivo tiene un uso potencial para estudiar aspectos biológicos de *M. sacchari* u otras especies de pulgones, como de otros artrópodos fitófagos pequeños.

Palabras clave: Áfido, biología, agar-disco foliar.

ABSTRACT. Four experimental arena were evaluated in laboratory conditions, in order to establish a methodology for the confinement of *Melanaphis sacchari* to study some aspects of its life cycle. The experimental arenas consisted of: "Full seedling rooted" (Arena 1), "Seedling with unique leaf" (Arena 2), "clip box" on seedling (Arena 3), "Agar-foliar disc" (Arena 4). The criteria for evaluation were: a) survival of aphids at least five days; b) facility of observation and manipulation; c) optimization of the space in bioclimatic chamber. The changes of every ninfal stages were based on the detection of the corresponding exuvia, the aphid maturity was recognized by the presence of the genital plate and the complete development of the cauda. The results showed that *M. sacchari* needs to remain underside the leaves, besides this situation the mobility impeded the follow-up in the arenas 1 and 2; whereas in the arena 3 and 4, it was achieved to observe the aborted embryos. The experimental arena 4 "agar-foliar disc" it was the device that fullfilled all the established criteria. It is considered that this arena will be useful to study the development of the other forms of *M. sacchari* or other aphid species, as well as other small phytophagous arthropods.

Key words: Aphid, biology, agar leafdisc.

INTRODUCCIÓN

El pulgón amarillo del sorgo (PAS), *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897) (Hemiptera: Aphididae), se detectó en cultivos de sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, de Guanajuato desde 2014, ocasionando pérdidas a la producción cercanas al 60 % en 2015 y 40 % en 2016;

inclusive, del 100 % en parcelas donde no se realizaron acciones de control oportunas (Quijano *et al.*, 2017).

El impacto de esta plaga en los cultivos de sorgo de México motivó diversos estudios, tales como biología básica; esto debido a que los pulgones presentan particularidades y eventos complejos relacionados con interacciones entre factores bióticos

(fenología de su planta hospedante) y abióticos (cambios en fotoperiodo y temperatura) (Dixon 1998, Hardie 2017). En el caso de Guanajuato, coexisten poblaciones del PAS que presentan partenogénesis obligada y cíclica (Peña-Martínez *et al.*, 2018b) además de eventos esporádicos de aborto (Peña-Martínez *et al.*, 2018a). Varios de estos aspectos biológicos no están estudiados a detalle, esto se debe en parte a la falta de dispositivos que permitan el desarrollo de los organismos bajo un riguroso control, lo cual tradicionalmente se ha realizado, para otras especies de áfidos, mediante su confinamiento en plantas completas con ventilación, en hojas vivas o recortadas, en recipientes llamados cajas-clip (Blackman, 1988; Tofangsazi, 2010; Araujo *et al.*, 2016; Leather *et al.*, 2017) y más recientemente sobre disco-foliar (Li y Akimoto, 2018). Para el caso del PAS, no existen estudios detallados sobre la tabla de vida, movilidad de las formas inmaduras y adultas de hembras ápteras vivíparas, ni del fenómeno de embriones abortados. Por tal motivo, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar arenas experimentales que permitan un control en el confinamiento del PAS para realizar futuros estudios a detalle sobre los diversos aspectos biológicos señalados.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, estado de México, México. En dicha institución se sembró el híbrido de sorgo UPM-219, uno de los más utilizados en Guanajuato y reconocido como material susceptible. Los ejemplares del PAS se obtuvieron de un pie de cría denominado "Juventino Rosas", proveniente de INIFAP-Bajío (Celaya, Guanajuato, México). Las poblaciones del pulgón se mantuvieron en material trasplantado (tres meses de edad) a macetas (8 kg) y bajo condiciones de invernadero. El experimento se desarrolló en cámara bioclimática (Shellab Modelo LI15; 25 °C, HR 60 ±10 %, fotoperiodo 12/12), en la cual se probaron cuatro arenas experimentales (tratamientos), cada una con 10 repeticiones:

Arena 1. "Plántula enraizada completa", de 25 días de edad con cinco a seis hojas desarrolladas.

Se colocó en un recipiente de plástico (elaborado con la unión de dos vasos de 250 y 500 ml). El vaso de menor capacidad sirvió para mantener a la planta hidratada (20 ml de agua), el otro vaso permitió la separación de raíz y parte aérea de la planta (tallo y hojas) por medio de una perforación en su base ($\varnothing = 1$ cm), se colocó plastilina en la parte perforada para fijar la planta (Fig. 1a).

Arena 2. "Plántula enraizada con hoja única", de 25 días de edad a las cuales se recortaron las hojas, permitiendo sólo el desarrollo de una para limitar área foliar. Dentro de un recipiente de plástico cubierto con tapa perforada cubierta con tela de organza (luz de malla 0.25 mm) para su ventilación, se colocó en un recipiente de manera similar a la arena 1 (Fig. 1b).

Arena 3. "Caja clip", dispositivo circular sujeto a una hoja mediante una pinza metálica, con diseño circular y con una base de cartón adherido a un aro de esponja; la parte superior de esta caja está elaborada de una tapa de caja Petri ($\varnothing = 4$ cm X 0.5 cm de altura) con una perforación central ($\varnothing = 1$ cm) cubierta con tela de organza (luz de malla 0.25 mm). Este diseño aisló un segmento de la hoja, permitiendo la ventilación y evitando a su vez la pérdida de embriones (Fig. 1c).

Arena 4. "Caja agar-disco foliar", Dispositivo a base de una caja Petri de plástico ($\varnothing = 3.5$ cm), en cuya base se vertieron 10 ml de agar bacteriológico (Conda-pronadisa[®]) con una concentración de 1.75 gr/100 ml de agua destilada (Figura 1D, 1E). Antes de la solidificación del agar se colocó un disco foliar de sorgo con el envés expuesto y se presionó ligeramente para adherirse. El tamaño del disco fue exacto al de la caja, esto con el fin de evitar que el insecto tuviera contacto con el sustrato. Para facilitar la ventilación se perforó la tapa y se cubrió con tela de organza (Fig. 1d). Después de colocar el pulgón sobre el disco, la caja se cerró y se colocó en posición invertida simulando la posición normal del pulgón en la planta.

En cada dispositivo se introdujo una hembra adulta de tres días de edad durante 16 h para obtener ninfas I. Posteriormente se retiró la hembra para realizar el seguimiento del desarrollo pre-reproductivo, reproductivo y post-reproductivo, realizando dos observaciones por día (9:00 y 16:00h). El cambio de estado ninfal se

registró con la exuvia (Fig. 1a), mientras que en el desarrollo reproductivo se registró el tipo de forma adulta, número de ninfas y/o aborto (s) o huevo (s), además del periodo post-reproductivo hasta la muerte de todos los organismos. El cambio de cada estadio ninfal se registró con base

en la detección de la exuvia (Fig. 2a), en tanto que la madurez se reconoció por la presencia de las placas anal y genital y el desarrollo completo de la cauda (Fig. 2 b). El aborto espontáneo de los embriones fue detectado "in situ" (Fig. 2 c), o bien sobre la luz de la malla (Fig. 2 d).

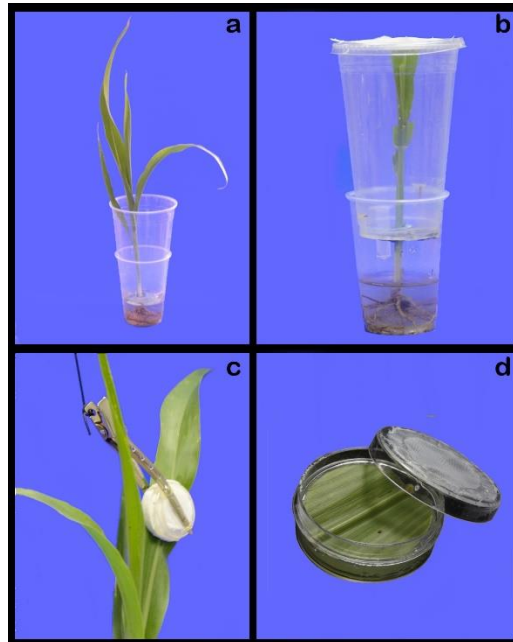


Figura 1. Dispositivos para contener y estudiar el desarrollo de *Melanaphis sacchari*. a) Arena 1. "Plántula enraizada completa" (25 días de edad) con raíz y cinco a seis hojas desarrolladas; b) Arena 2. "Plántula con hoja única" (25 días de edad) con raíz y hoja única, c) Arena 3. "Caja clip" (planta de 40 días de edad), d). Arena 4. "Caja agar- disco foliar" (planta de 50 días de edad).

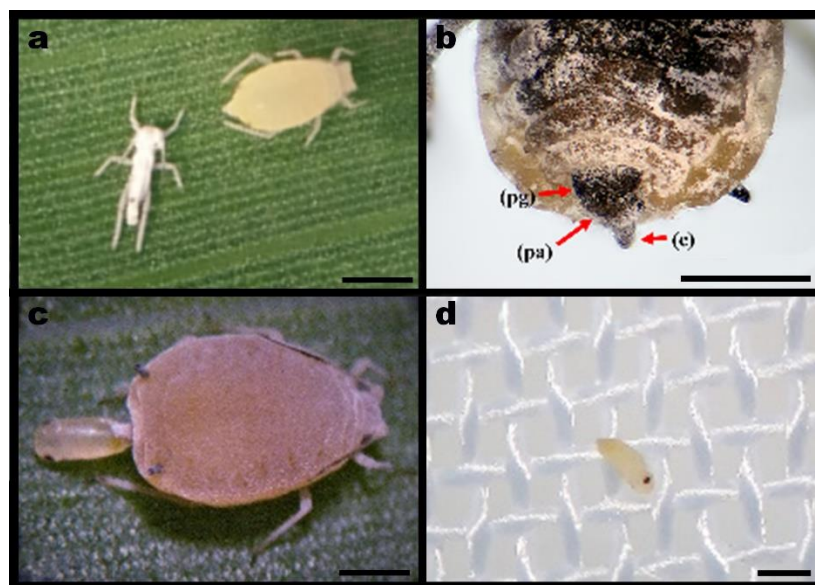


Figura 2. Observaciones de eventos de desarrollo en *Melanaphis sacchari*. a) ninfa y exuvia; b) caracteres de hembra áptera adulta de *M. sacchari*, (pg= placa genital, pa= placa anal, c= cauda); c) aborto en tejido vegetal; d) embrión abortado en tela de arena experimental. Unidad 3µm.

El criterio de selección de arenas se basó en las propuestas de Blackman (1988) sobre las características útiles para el desarrollo de crías de pulgones: 1) Proporcionar una fuente de alimentación continua y en condición fisiológica adecuada (se requirió que el material vegetal durara un tiempo mínimo de cinco días para permitir el desarrollo ninfal); 2) técnica de confinamiento apropiado (eficiencia medida por la facilidad de observación y manipulación); 3) Optimización de espacio dentro de las cámaras de cría. El costo unitario de cada dispositivo se calculó, considerando la adquisición de la semilla y el proceso de desarrollo de las plantas, además de los materiales requeridos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los diseños experimentales con planta completa (arena 1 y 2) fueron los más económicos (\$2.20 y 6.15 por unidad), aunque ocuparon mayor volumen dentro de la cámara bioclimática, lo que limitó el número de repeticiones. Las características estructurales de estas plantas y su crecimiento impidió mantenerlas por un tiempo prolongado. La tercera arena (caja clip) tuvo un costo de \$6.65 por unidad; existieron inconvenientes con el desplazamiento de los pulgones, los cuales se dirigieron desde las primeras horas de exposición, hacia la zona de ventilación donde al parecer permanecieron sin alimentarse y murieron 48 horas después.

La cuarta arena experimental (agar-disco foliar) tuvo un costo de \$18.10, requirió de una inversión inicial de \approx \$6,000.00 y mayor metodología (Cajas de plástico recortadas para incorporar la tela de organza, recorte de hojas con sacabocados especial, compra de reactivos agar y antibiótico, además de equipo e insumos para esterilización). Este fue el único dispositivo en el que se registró detalladamente el desarrollo completo de los organismos. En adición, esta arena mantuvo turgente el tejido vegetal durante \approx cinco días, lo que facilitó la manipulación de los ejemplares, optimizó el espacio en la cámara de cría y permitió observaciones más precisas sobre los eventos de aborto. El traslado de los organismos hacia nuevos discos foliares requirió de un proceso de manipulación delicado, ya que se

observó que la remoción con pincel o pinzas, puede dañar a los organismos (principalmente a las ninfas I), debido a que su estilete permanece insertado en el mesófilo de la hoja. Para evitar la muerte de los organismos se cortó la hoja el área circundante al pulgón, con lo cual se logró trasladar este tejido junto con el pulgón a otra arena con nuevo disco foliar. Dicha técnica resultó efectiva, permitiendo que eventualmente el organismo retirara su estilete e iniciara su alimentación en la nueva arena y completara su ciclo.

El uso de plantas completas para el estudio de *M. sacchari* fue ineficiente debido a la movilidad de esta especie, lo cual contrasta con la conceptualización generalizada que califica a los pulgones como “aparentemente sedentarios” (Feres *et al.*, 2017). La orientación de estos organismos hacia el envés, quizá fomentada por la búsqueda de puntos de alimentación (Feres *et al.*, 2017), no permitió ubicar con precisión las mudas, embriones o huevos en las tres primeras arenas experimentales. Algunos estudios sobre biología básica del PAS se han realizado con hojas maduras de sorgo (Setokuchi, 1973), además de aislamientos mediante la técnica de "caja clip" (Hinson, 2017). En ambos casos, no se reporta suficiente detalle metodológico que permita reproducir estos dispositivos para compararlos con los propios de la presente investigación. Si bien el uso de la "caja clip" es más recurrida sobre especies de poca movilidad, presenta también desventajas (Leather *et al.*, 2017), la más importante fue la dificultad para el establecimiento del PAS.

Los resultados obtenidos con la arena agar-disco foliar tienen un uso potencial para realizar diversos estudios del PAS, debido a que este dispositivo proporcionó un espacio de confinamiento controlado con alimentación continua. De acuerdo con Li y Akimoto (2018), el flujo del floema no es esencial para el crecimiento y reproducción del pulgón, dado que al cortar la hoja el flujo de floema se detiene, mientras que se podrían inducir algunas defensas de la planta contra la alimentación del pulgón (Louis y Shah, 2015). Es probable que los valores que se obtengan con esta técnica puedan extrapolarse a sistemas con confinamiento de plantas completas,

como se demostró en los estudios biológicos del pulgón del chícharo *Acyrtosiphon pisum* (Harris) tanto con plántulas de haba *Vicia faba* como con disco foliar (Li y Akimoto, 2018). Esta técnica ha tenido un gran potencial para realizar, entre otros estudios, evaluación de resistencia a variedades de plantas (Montlor *et al.*, 1990) y a insecticidas (Insecticide Resistance Action Committee, 2016).

CONCLUSIÓN

La movilidad de las formas ápteras vivíparas de *M. sacchari* dificultó las observaciones en todos los diseños evaluados. El dispositivo a base de agar-disco foliar fue la metodología más compleja, elaborada y de mayor costo; no obstante, fue la única con la que se completó el registro de desarrollo del pulgón, además de optimizar la manipulación de ejemplares y ocupar menor espacio dentro de la cámara de cría. Esta arena se propone como una metodología de mayor precisión para llevar a cabo diversos estudios del PAS, además de otras especies de pulgones y pequeños artrópodos fitófagos.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Guanajuato Produce A. C. Celaya, Guanajuato, por el apoyo económico al Proyecto: “Determinación de tablas de vida de PAS”. Al Dr. Rafael Bujanos-Muñiz (INIFAP Bajío, Celaya, Gto.) por la donación del pie de cría del PAS y al Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV Irapuato) y al Dr. Jorge Valdez-Carrasco (IFIT-CP) por material fotográfico.

LITERATURA CITADA

ARAUJO, E. S., BENATTO, A., MÓGOR, Á. F., PENTEADO, S. C. AND M. A. C. ZAWADNEAK. 2016. Biological parameters and fertility life table of *Aphis forbesi* Weed, 1889 (Hemiptera: Aphididae) on strawberry. *Brazilian Journal of Biology*, 76(4): 937–941. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.04715>.

BLACKMAN, R. L. 1988. Rearing and handling aphids. Pp 59–68 In: A. K. MINKS AND P. HARREWIJN (Eds.). *World Crop Pests, Vol. 2. Aphids; their*

biology, natural enemies and control, PART B. Elsevier, Amsterdam.

DIXON, A. F. G. 1998. *Aphid Ecology*. Second Edition. Chapman & Hall. London. 300 pp.

FERERES, A., IRWIN, M. E. AND G. E. KAMPMEIER. 2017. Aphid Movement: Process and Consequences. Pp. 196–224. In: H. F. VAN EMDEN. AND R. HARRINGTON (Eds.) *Aphids as Crop Pests 2nd edition*. CAB International. Cambridge, MA, USA.

HARDIE, J. 2017. Life cycles and polyphenism. 2017. Pp. 81–97 In: H. F. VAN EMDEN AND R. HARRINGTON (Eds.) *Aphids as Crop Pests 2nd edition*. CAB International. Cambridge, MA, USA.

HINSON, P. O. 2017. *Effect of temperature on the development of sugarcane aphid, Melanaphis sacchari, on Sorghum*. Thesis Master of Science, Plant, Soil and Environment. West Texas A&M University, Canyon, Texas. 83 pp.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. 2016. Test Method, Pea Aphid. Available in: <http://www.irc-online.org/methods/aphids-adultnymphs/> (Fecha de consulta: 14-XII-2017).

LEATHER, S. R., AWMACK, C. S. AND M. P. D. GARRATT. 2017. Growth and development. Pp. 98–113. In: H. F. VAN EMDEN AND R. HARRINGTON *Aphids as Crop Pests, 2nd edition*. CAB International.

LI, Y. AND S. I. AKIMOTO. 2018. Evaluation of an aphid-rearing method using excised leaves and agar medium. *Entomological Science*, 21(2): 210–215. DOI: <https://doi.org/10.1111/ens.12296>.

LOUIS J. AND J. SHAH. 2015. Plant defence against aphids: the PAD4 signalling nexus. *Journal of Experimental Botany*, 66(2): 449–454. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru454>.

MONTLLOR, C. B., CAMPBELL, B. C. AND T. E. MITTLER. 1990. Responses of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) to leaf excision in resistant and susceptible sorghum. *Annals of Applied Biology*, 116, 189–198. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1990.tb06598.x>.

PEÑA-MARTÍNEZ, R., LOMELI FLORES, J. R., BUJANOS-MUÑIZ, R., MUÑOZ-VIVEROS, A. L., VANEGAS-RICO, J. M., SALAS-MONZÓN, R., HERNÁNDEZ-TORRES, O. E., MARÍN-JARILLO, A. Y J. E. IBARRA-RENDÓN. 2018a. *Pulgón amarillo del sorgo, (PAS), Melanaphis sacchari (Zehntner, 1897), interrogantes biológicas y tablas de vida*. Fundación Guanajuato Produce, A. C. 46pp. ISBN: 978-607-96123-8-2

PEÑA-MARTÍNEZ, R., MUÑOZ-VIVEROS, A. L., MARÍN-JARILLO, A., BUJANOS-MUÑIZ, R., LUÉVANO-BORROEL, J., SÁNCHEZ-SEGURA, L. AND J. E. IBARRA. 2018b.

- Spontaneously aborted embryos in *Melanaphis sacchari* (Zehntner 1897) (Hemiptera: Aphididae). *Annals of the Entomological Society of America*, 111(6): 312–318. DOI: <https://doi.org/10.1093/aesa/say020>.
- QUIJANO-CARRANZA, J. A., PECINA-QUINTERO, V., BUJANOS-MUÑIZ, R., MARÍN-JARILLO, A. Y R. YÁÑEZ-LÓPEZ. 2017. *Guía 2017 Para El Manejo Del Pulgón Amarillo Del Sorgo*. Comité Técnico de Pulgón Amarillo del Sorgo en Guanajuato. Folleto para productores. No. 1. febrero 2017. Fundación Guanajuato Produce A.C. Celaya, Guanajuato. 42 pp. ISBN: 978-607-96123-4-4.
- SETOKUCHI, O. 1973. Ecology of *Longiunguis sacchari* (Zehntner) (Aphididae) infesting sorghums I. Nymphal period and fecundity of apterous viviparous female. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu*, 19(1): 95–97. DOI: <https://doi.org/10.4242/kyubyochu.22.139>.
- TOFANGSAZI, N., KHERADMAND, K., SHAHROKHI, S. AND A. A. TALEBI. 2010. Temperature-dependent life history of *Schizaphis graminum* on barley. *Bulletin of Insectology*, 63(1): 79–84, 2010.