

EFFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y DETERMINACION DE LA
PATOGENICIDAD PARA LARVAS DE Hypsipyla grandella (Zeller)
EN MUTANTES DE Metarrhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin

Tesis de Grado de Magister Scientiae

Jorge Del Pozo Valdez



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación
Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales
Turrialba, Costa Rica
Setiembre, 1973

EFFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y DETERMINACION DE LA
PATOGENICIDAD PARA LARVAS DE Hypsipyla grandella
(ZELLER) EN MUTANTES DE Metarrhizium anisopliae
(METCHNIKOFF) SOROKIN

Tesis




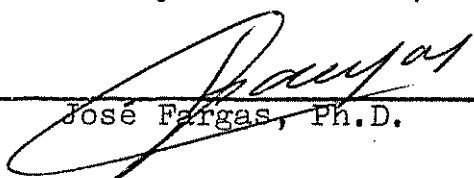
Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:

	
_____ Oscar Hidalgo-Salvatierra, Ph.D.	Consejero
	
_____ Gilberto Páez, Ph.D.	Comité
	
_____ Jeremy S. Lawrence, Ph.D.	Comité
	
_____ José Fargas, Ph.D.	Comité

Setiembre 1973

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su agradecimiento al Dr. Oscar Hidalgo-Salvatierra, Consejero Principal, por la valiosa y acertada dirección en la ejecución del presente trabajo.

A los Drs. Jeremy Lawrence, José Fargas y Gilberto Páez, miembros del Comité, por las sugerencias y colaboración en la revisión del original.

Al Gobierno de Holanda por haberle otorgado la beca y al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA por la oportunidad brindada para ingresar a la Escuela para Graduados del IICA-CTEI.

A todas las personas que le prestaron su gentil colaboración durante el planteamiento y desarrollo del presente estudio y biblioteca del CIDIA-IICA.

BIOGRAFIA

El autor nació en Huancavilica, Perú, el 23 de enero de 1943.

Realizó sus estudios secundarios en el colegio Saleciano "Santa Rosa" de la ciudad de Huancayo y los profesionales en la Universidad Nacional Agraria "La Molina", Lima, graduándose de Ingeniero Agrónomo.

En 1969 se inició en la docencia universitaria en calidad de Jefe de Práctica a dedicación exclusiva, adscrito al Departamento Académico de Agronomía y Forestales en la Universidad Nacional del Centro del Perú, habiendo dictado las siguientes asignaturas: Fitopatología General y Aplicada, Entomología General y Aplicada, y Ecología.

En setiembre de 1971 ingresó a la Escuela para Graduados del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA en Turrialba, Costa Rica, para realizar estudios de postgrado en la especialidad de Fitotecnia, habiéndose obtenido el grado Magister Scientiae en setiembre de 1973.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Los Hongos Entomopatógenos	3
2.2 Características de <u>Metarrhizium anisopliae</u> (Metchnikoff) Sorokin	4
2.3 Patogenicidad de <u>M. anisopliae</u>	7
2.4 El Barrenador de las Meliáceas	8
2.5 Radiaciones	10
2.6 Efecto de las Toxinas	13
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Localización del Estudio	15
3.2 Cultivo del Hongo	15
3.3 Medios de Cultivo para Detectar Actividad Enzimática	16
3.4 Cría del Insecto	18
3.5 Selección de Larvas de <u>H. grandella</u> en Quinta Fase	19
3.6 Incubación	19
3.7 Prueba de Patogenicidad de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes	19
3.7.1 Cálculo de la mortalidad	21
3.7.2 Determinación de la concentración letal-50	22
3.8 Efecto de las Micotoxinas Producidas por el Hongo	22
3.9 Efecto de las Radiaciones sobre la Capacidad de Formar Colonias	23
3.10 Corrección de la Evaporación de la Suspensión de Esporas en el Proceso de Irradiación	24
4. RESULTADOS	
4.1 Patogenicidad del Hongo <u>M. anisopliae</u> y sus Mutantes	25
4.2 Efecto de las Radiaciones sobre la Capacidad para Formar Colonias en Esporas de <u>M. aniso-</u> <u>pliae</u> y sus Mutantes	34
4.3 Prueba de Corrección de Evaporación de la Suspensión de Esporas en el Proceso de Irra- diación	38
4.4 Actividad Enzimática	38
4.4.1 Efecto de la actividad de las toxinas producidas en el desarrollo del hongo en el medio líquido SDAY	41

	<u>Página</u>
5. DISCUSION	46
6. CONCLUSIONES	51
7. RESUMEN	53
7a. SUMMARY	55
8. LITERATURA CITADA	57
APENDICE	63

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro no.</u>		<u>Página</u>
1	Mortalidad de larvas de <u>H. grandella</u> en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <u>M. anisopliae</u>	26
2	Mortalidad de larvas de <u>H. grandella</u> en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <u>M. anisopliae</u> FB-7-3	26
3	Mortalidad de larvas de <u>H. grandella</u> en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <u>M. anisopliae</u> FB-9-2	26
4	Mortalidad de larvas de <u>H. grandella</u> en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <u>M. anisopliae</u> FB-13	27
5	Mortalidad de larvas de <u>H. grandella</u> en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <u>M. anisopliae</u> FB-6-2	27
6	Valores de las ecuaciones de regresión y R^2 de la dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes sobre las larvas de V fase de <u>H. grandella</u>	33
7	Límites de confianza al 95 por ciento de los valores de la pendiente de <u>M. anisopliae</u> y de los cuatro mutantes	33
8	Número de esporas viables por ml de <u>M. anisopliae</u> requeridas para producir el 50 por ciento de mortalidad en la V fase de <u>H. grandella</u>	33
9	Fracción sobreviviente de esporas de 60 días de edad, almacenadas a 4 C de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes a una dosis baja y alta de irradiación ultravioleta 254 nm	37
10	Fracción sobreviviente de esporas de 90 días de edad de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes a una dosis baja y alta de irradiación ultravioleta 254 nm, almacenadas a 4C	37
11	Efecto de las toxinas producidas por <u>M. anisopliae</u> silvestre y sus mutantes, incubados en medio líquido SDAY por tres períodos diferentes, sobre el porcentaje de pupación de larvas de <u>H. grandella</u> a los 28 días después del tratamiento	43
12	Efecto de las toxinas producidas por <u>M. anisopliae</u> silvestre y sus mutantes, incubados en medio líquido SDAY por tres períodos diferentes, sobre el porcentaje de mortalidad total de larvas de <u>H. grandella</u>	45

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura no.</u>		<u>Página</u>
1	Cápsulas cefálicas de las seis fases de <u>H. grandella</u> colectadas después de cada ecdisis.	20
2	Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> sobre larvas de V. fase de <u>H. grandella</u>	28
3	Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> FB-6-2 sobre larvas de <u>H. grandella</u>	29
4	Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> FB-7-3 sobre larvas de <u>H. grandella</u>	30
5	Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> FB-9-2 sobre larvas de <u>H. grandella</u>	31
6	Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de <u>M. anisopliae</u> FB-13 sobre larvas de <u>H. grandella</u>	32
7	Capacidad relativa de las esporas de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes para formar colonias, después de irradiadas con luz ultravioleta 254 nm, ($I_0 = 17,5$ ergios/mm ² /seg) a los 60 días de edad	35
8	Capacidad relativa de las esporas de <u>M. anisopliae</u> y sus mutantes para formar colonias, después de irradiadas con luz ultravioleta 254 nm ($I_0 = 17,5$ ergios/mm ² /seg) a los 90 días de edad	36
9	Evaporación de agua en el proceso de irradiación ultravioleta 254 nm ($I_0=17,5$ ergios/mm ² /seg)	39
10	Capacidad relativa de formar colonias de las esporas de <u>M. anisopliae</u> FB-13, añadiéndole cantidad de agua evaporada según Figura 9 en el proceso de irradiación ultravioleta 254 nm	40
11	Efecto de la ingestión de las toxinas producidas por <u>M. anisopliae</u> silvestre sobre el desarrollo de las larvas de <u>H. grandella</u> . La larva de la izquierda es la larva del testigo y las de la derecha muestran efecto del aumento en la concentración de toxinas	42

1. INTRODUCCION

Las radiaciones ionizantes y no ionizantes son usadas para inducir mutaciones y aberraciones cromosómicas tanto en los microorganismos como en las plantas superiores para obtener nuevos individuos con características mejoradas.

Mediante las radiaciones gamma se han obtenido varios mutantes del hongo Metarrhizium anisopliae (Metch.) Sorokin al tratar de mejorar ciertas características como patogenicidad, viabilidad, liberación de esporas, cantidad de esporas y resistencia a la luz ultravioleta. La efectividad de un microorganismo en un programa de control biológico depende de su habilidad para resistir las condiciones ambientales en particular la luz ultravioleta presente en la radiación solar, y de su capacidad para invadir los tejidos del insecto a controlar. Esta última capacidad se refleja en la acción de las enzimas y toxinas secretadas por el micelio invasor.

M. anisopliae es patógeno para el barrenador, Hypsipyla grandella (Zeller) plaga muy seria en las Meliáceas de muy alto valor comercial como el cedro (Cedrela sp.) y la caoba (Swietenia sp.). El control del barrenador es muy difícil debido en parte a sus hábitos de ataque, al alto costo de los insecticidas químicos y a la falta de conocimientos sobre su ecología y dinámica de poblaciones. Esta plaga es la causa principal, por la cual, las Meliáceas no han sido cultivadas económicamente hasta el momento en las regiones tropicales de América, Asia y África. Por esta razón se formó un grupo de trabajo con el propósito de atacar el problema en forma integrada, es decir, mediante la combinación de métodos químicos, biológicos y culturales.

Como resultados de estudios anteriores, sobre la patogenicidad y el efecto de la radiación gamma y ultravioleta en el tipo silvestre de M. anisopliae, se obtuvieron varios mutantes de color denominados FB-6-2, FB-7-2, FB-9-2 y FB-13, pero cuyas características no fueron determinadas.

Por esta razón el objetivo de este trabajo fue:

1. Determinar la patogenicidad de dichos mutantes usando larvas de H. grandella como organismo de prueba.
2. Estudiar el efecto de la radiación ultravioleta en su capacidad de formar colonias.
3. Determinar el efecto de las toxinas que excretan sobre el crecimiento de larvas de H. grandella.
4. Determinar la actividad enzimática de las cepas estudiadas.

2. REVISION DE LITERATURA

La mayoría de los hongos entomopatógenos son parásitos facultativos ya que en determinadas condiciones pueden alimentarse en materia orgánica en descomposición (36, 57, 58). Su vida no depende absolutamente de sustratos vivientes. Existen diferentes grados de adaptación a la vida parasitaria, en un extremo se encuentran la mayoría de los entomoptoráceos y ciertos hongos inferiores como Myiophagus y Coelomomyces, que se encuentran sólo en insectos; en el otro extremo se hallan especies como Aspergillus flavus y Mucor hiemalis para los cuales la parasitización sobre insectos es probablemente un episodio puramente accidental dentro del ciclo de vida normal (35).

2.1 Los Hongos Entomopatógenos

Hongos entomopatógenos se encuentran dentro de las diferentes subdivisiones de la división Eumycota.

Entre la subdivisión de los zigomicotinos que atacan insectos se cuentan los géneros Empusa, Entomophthora, Massospora y Coelomomyces, que se reconocen por sus hifas no septadas y multinucleadas; sus órganos sexuales son un tipo de esporas aplanadas.

Los ascomicotinos entomopatógenos se encuentran en los géneros Cordyceps, Sphaerostilbe, Hirsutella, Sporotrichum, Podonectria e Hypocrella, caracterizándose por la formación de un asca unicelular que contiene un número definido de esporas.

Los basidiomicotinos presentan poca importancia como entomopatógenos, tienen una formación especial, el basidio, el cual produce basidiosporas en el extremo de finas protuberancias llamadas esteriguatas.

Dentro de los deuteromicotinos u hongos imperfectos se encuentran muchos géneros que atacan insectos como Fusarium, Metarrhizium, Sorospora, Beauveria, Microcera, Aspergillus y otros. El desconocimiento del estado perfecto de algunas especies ha decidido su inclusión en este grupo (2, 60).

2.2 Características de Metarrhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin

El género Metarrhizium comprende cuatro especies: M. anisopliae, M. album, M. brunneum y M. glutinosum (58).

M. anisopliae se caracteriza por sus esporas de 5 a 7,5 μ de largo por 2,3 a 3,5 μ de ancho. Requiere una humedad relativa superior a 92,5 por ciento y una temperatura entre 15 y 35 C para que las esporas germinen, crezca el micelio y esporule, con un óptimo a 100 por ciento de humedad relativa y a una temperatura entre 25 y 30 C (58, 60).

Crece fácilmente en medios artificiales. Bajo condiciones de laboratorio, temperaturas entre 24 y 26 C son óptimas para el crecimiento, siendo el rango normal entre 10 y 30 C. La habilidad de germinar se pierde a 55 a 60 C durante 5 minutos. Para el crecimiento normal requiere un pH entre 4,7 a 10, siendo el pH óptimo entre 6,9 y 7,4. El color de las esporas es verde y no es característico en todas las especies del género Metarrhizium ya que el M. album tiene las esporas blancas, M. brunneum las tiene amarillo café y M. glutinosum presenta sus esporas de colores que van desde verde oliváceo hasta negro oliváceo (42, 53, 58).

Walstad, Anderson y Stambaugh (65) estudiando el efecto de factores ambientales sobre Beauveria bassiana y M. anisopliae, encontraron que germinan a una temperatura entre 10 y 35 C,

realizando la más rápida germinación entre 25 y 30 C. El tiempo requerido para germinar a temperatura entre 20 y 30 C fue de cuatro días, también lograron determinar que a 8 C las esporas permanecen viables por lo menos 12 meses y a los 21 C sobreviven sólo un período de 2,5 meses. La longevidad de la conidia de M. anisopliae decrece conforme la temperatura de almacenaje aumenta de 8 a 25 C, es también reducida por exposición a la luz visible (11) y la mínima humedad media está cerca de 45 por ciento HR.

El hongo infecta los insectos a través del tegumento y con baja frecuencia a través de la pared del tubo digestivo. A veces penetra por los espiráculos. El tegumento es una estructura compleja compuesta de una capa continua de células epidérmicas recubiertas de cutícula. La continuidad del tegumento es rota por los espiráculos o aberturas extremas de las tráqueas y la capa de cera de la epicutícula evita sin duda que muchos hongos entren en el cuerpo. Es muy posible que la cutícula cérica de los insectos sea perforada mecánicamente, aparte que la movilidad misma del insecto debe facilitar la entrada debido al desgaste de la cutícula (35, 51).

El éxito de la infección a través del tegumento requiere condiciones de temperatura favorable y elevada humedad durante la penetración del tubo germinal del hongo en el hospedero. El requisito de HR es con frecuencia expuesto como un argumento contra su uso efectivo en el control biológico. Veen (63) sin embargo, dice que la infección a través del tracto digestivo obvia la necesidad de condiciones externas de alta humedad. El tiempo que transcurre desde la infección hasta la muerte del insecto depende de la clase de hongo, del insecto y las condiciones reinantes. Por lo general, el período varía entre 2,7 días. Es posible que sea una sola y

determinada acción del hongo lo que ocasiona la muerte del insecto. Hay acciones letales importantes como histólisis causado por sustancias segregadas por el hongo, destrucción de glóbulos sanguíneos, producción de toxinas y acciones mecánicas que impiden el funcionamiento de las tráqueas y espiráculos o bien destruyen el sistema nervioso. Además, estos hongos demuestran un grado variable de especificidad contra sus hospedantes debido a la existencia de sustancias antifúngicas específicas en la cutícula de los insectos. Hay un grado variable de susceptibilidad observado a lo largo de diferentes estadios de desarrollo del insecto (35, 60).

La acción de M. anisopliae sobre larvas de elatéridos (coleópteros) revela que la penetración ocurre directamente a través de la cutícula membranosa o esclerotizada, facilitada por mecanismos enzimáticos y presión mecánica (34). Shaerffenberg (53) considera como pre-requisito muy importante la predisposición del hospedero y una adecuada virulencia del hongo para que la infección prospere.

La penetración de la hifa de M. anisopliae ha sido observado alrededor de la implantación de las piezas bucales, y cerca del comienzo del esófago en Ephestia kühniella, también se ha observado que ninfas de 2do. instar de Schistocerca gregaria fueron fácilmente infestadas cuando esporas de M. anisopliae se les dió en su alimento (63). Gabriel (18) en una serie de experimentos encontró que cuando las conidias de M. anisopliae eran suministradas oralmente a larvas de Galleria mellonella, Bombyx mori y Tenebrio molitor causaban menor infección que cuando eran aplicadas exteriormente sobre el integumento.

Los síntomas del ataque de hongos en los insectos se manifiestan por: a) cambios de conducta como pérdida de apetito, parálisis parcial, apatía y la larva pierde el reflejo de enderezamiento permaneciendo encorvada; b) sufre decoloración debido al color mismo del hongo o pigmentos que este produce; c) cambios de estructura externa e interna ya que el hongo al penetrar en el hospedero perfora las membranas intersegmentarias del abdomen, las hifas invaden además del tejido adiposo, los sistemas musculares y nerviosos y la presencia misma del hongo que llena el cuerpo del insecto de la característica de rigidez post-mortal de la larva; d) alteraciones fisiológicas como aumento del consumo de oxígeno, histólisis producto de actividad enzimática y pérdida de peso. Estos síntomas se pueden presentar al mismo tiempo o de modos sucesivos (35, 58). A partir del cuarto día hasta el séptimo se presentan la mayor mortalidad (21, 58).

2.3 Patogenicidad de *M. anisopliae*

M. anisopliae es parásito de muchos insectos y es probable que haya sido el primer hongo usado en el control de plagas con hongos (60).

En muchos experimentos (5, 6, 8, 21, 30, 53, 68, 69) se ha probado la patogenicidad de este hongo. Se demostró la patogenicidad de *M. anisopliae* para larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) y se concluyó que este hongo debe ser considerado como un agente potencial de control en la lucha integrada contra este insecto (5). Berríos (6), por ejemplo, ha demostrado que la quinta fase larval es más susceptible al hongo *M. anisopliae*. También la patogenicidad está directamente relacionada con la concentración de esporas (4) a la que se exponen las larvas.

2.4 Barrenador de las Meliáceas

Numerosos trabajos se han realizado en las zonas tropicales para resolver el problema de la silvicultura de Cedrela y otras Meliáceas latinoamericanas, pero en realidad todos los esfuerzos para cultivarla económicamente han fracasado por el daño de H. grandella y por una mala interpretación de la naturaleza ecológica de la especie.

Las características taxonómicas, biológicas y ecológicas de H. grandella han sido descritas por Dourojeanni (14), Entwistle (15), FAO Staff (17), Grijpma (22), Heinrich (26), Ramírez (44, 45), Roovers (50), Tillmans (61) y Yaseen y Bennett (67).

El control del ataque de Hypsipyla en los últimos años es objeto de un estudio intensivo a nivel entomológico, introducción y zonificación de Meliáceas resistentes, y el uso de métodos silviculturales para reducir el daño a niveles tolerantes, admitiendo que el daño siempre existirá (3, 14, 17, 44, 64).

El control mediante el uso de métodos silviculturales implica reconocer que la actividad del insecto depende de un estado fisiológico del huésped, ya que el ataque del insecto está relacionado con los siguientes aspectos: el tipo de suelo, porque la reacción de las plantas al ataque del insecto se produce más rápidamente en los sitios más favorables para el crecimiento, mientras que en los suelos arenosos esta recuperación es más lenta, por las condiciones de nutrición desfavorables para el crecimiento continuo de plantas; intensidad de luz, porque la máxima intensidad de ataque se produce en condiciones de campo abierto; la susceptibilidad y resistencia de los árboles que dependen del vigor de las mismas, las que están condicionadas por el tipo de suelo y el grado de iluminación (14, 17, 28, 61).

El control químico es factible pero no parece ser satisfactoriamente económico para controlar la plaga (7, 14, 44). Ramírez (44), por ejemplo, obtuvo un control de 100 por ciento utilizando Aldrín, Endrín, Telodrín, DDT cuando hacía tres aplicaciones a intervalos de seis días en el período de oviposición. En el IICA (7) se encontró que de 28 insecticidas sistémicos probados en laboratorio sólo cinco proporcionaron protección completa. En el Perú, Dourojeanni (14) informa que Parathion se comporta mejor que el DDT y ciertos productos arsenicales.

El control biológico hasta el momento no ha sido estudiado profundamente, pero la crianza, selección o el descubrimiento de un patógeno agresivo podría contribuir en la lucha integrada contra esta plaga, ya que el control químico resulta muy costoso y tiene poco efecto residual debido a las altas precipitaciones.

Rao y Bennett (46), encuentran posibilidades de control biológico y dan una lista de enemigos naturales de H. grandella pertenecientes a las familias Braconidae, Ichneumonidae, Chaloidae y Tachinidae. Yaseen y Bennett (67) encontraron varios parásitos pertenecientes a las familias Trichogrammatidae, Braconidae y Hermithidae. En Turrialba (7) se han encontrado varios parásitos de Hypsipyla pertenecientes a las familias Trichogrammatidae, Braconidae y Mermithidae.

Estudios sobre el potencial del control microbiológico de Hypsipyla recién se están iniciando. Kandasamy (32) informa que H. robusta es susceptible al hongo Beauveria tenella. Berríos e Hidalgo-Salvatierra (4, 5) han demostrado la susceptibilidad de esta plaga a M. anisopliae, Beauveria bassiana y B. tenella.

También se ha demostrado (27, 31) que H. grandella es susceptible a la bacteria Bacillus thuringiensis.

La importancia de utilizar el control microbiológico ha aumentado debido a que los insecticidas químicos destruyen a los enemigos naturales, razón por la cual aparecen plagas secundarias, las plagas se hacen resistentes a los insecticidas y la acumulación de residuos tóxicos en suelos, plantas, animales y agua (3). Hall (25) considera en el campo del control microbiológico la importancia de determinar la susceptibilidad de insectos a patógenos en experimentos de laboratorio porque los resultados indican el grado de susceptibilidad que servirá como guía para pruebas de aplicación en el campo. Hall (24) considera este control como una parte del complejo ecológico.

2.5 Radiaciones

El daño inducido por las radiaciones se produce a nivel molecular. Si las moléculas afectadas no son metabolizadas dentro de cierto tiempo, este daño puede llegar a expresarse a nivel celular. Por lo común, estos cambios biológicos no se aprecian durante el proceso de irradiación, pueden observarse después de minutos, días, meses y aún años después de ocurrido el tratamiento (40). Según Sparrow (56) que ha estudiado la radiosensitividad de más de 100 especies de plantas representativas de 35 familias diferentes, la dosis letal de radiación comienza de 1000 a 200000 roentgen (1000 r para el Podophylum pectatum, hasta 200000 r para el Cerptopetalum McDongellic). Gunthardt (23) indica que por lo general los tejidos de plantas jóvenes son más sensibles a la irradiación que los de plantas adultas, pero las semillas viejas irradiadas producen una frecuencia mayor de aberraciones cromosómicas que las

semillas frescas.

Los efectos citológicos de las radiaciones en el citoplasma pueden causar degeneración en los plastidios y mitocondrios. En general para una cierta dosis, los cambios en el citoplasma son menos perjudiciales para el desarrollo de las células que los producidos en el núcleo (55).

Según Cooke (12) y Carlson (10) la radiación aplicada a los cromosomas en la profase tiene una reversión en los procesos mitóticos. Smith y Hanawalt (54) indican que la luz ultravioleta tiene efectos en sistemas biológicos que se explican mediante cambios específicos en la naturaleza física y química del ADN (ácido deoxiribonucleico). Los cambios químicos que se llevan a cabo sobre los constituyentes del ADN, en las purinas y principalmente sobre las pirimidinas son de naturaleza variada, así como formación de productos de hidratación, formación de dímeros tipo ciclo butano de timina, citocina y uracilo; formación de varios tipos de fotoproductos, reducción del peso molecular del ADN, ligamento de cadenas de ADN y ligamento de cadenas de ADN a cadenas de proteínas. Las radiaciones gamma son menos selectivas que las ultravioletas, pero ambas radiaciones afectan el ADN. Los efectos que producen en el ADN las radiaciones gamma son varios, como ruptura en los enlaces de hidrógeno, degradación de las bases nucleadas y ruptura de la cadena la cual está correlacionada con la inactivación biológica.

Cadahia (9) dice que al exponer una célula a una fuente de irradiación, las radiaciones causan asociaciones y reagrupaciones moleculares, y cuando las moléculas afectadas forman parte de los genes localizados en los cromosomas, entonces se interfiere con

las características hereditarias y aparecen las mutaciones.

Las curvas de sobrevivencia o capacidad de formar colonias de los hongos a las radiaciones fueron determinadas para obtener una indicación de la sensibilidad de las esporas a las irradiaciones. Trabajos de determinación de sobrevivencia a radiación ultravioleta en hongos han sido realizados por Hollaender y otros (29), por ejemplo, con el hongo Neurospora crassa la sobrevivencia de esporas jóvenes fue reducida.

Según Chaou y otros (13) trabajando con radiación gamma sobre Penicillium expansium y por Malla y otros (36) al estudiar la susceptibilidad de cepas de Penicillium viridicatum y A. flavus a la irradiación beta han obtenido en todos los casos que la sobrevivencia de las conidias fue reducida por la irradiación y la sobrevivencia de las conidias irradiadas varió según la edad de las esporas, siendo mayor en esporas jóvenes y menor en esporas viejas.

Sansome y otros (52) han obtenido mutantes de diferente coloración trabajando con el hongo N. crassa. Berríos (4) irradiando al hongo M. anisopliae con rayos gamma de 198 kr obtuvo mutantes cuyas esporas son de colores amarillo café, café rojizo, gris plateado y blanco.

Meyrath y otros (38) utilizando diferentes irradiaciones, ultravioleta, gamma y neutrones rápidos en mutantes de Aspergillus oryzae han comprobado que dosis altas de irradiación no son particularmente adecuadas para la habilidad específica de producción de amilana o actividad enzimática de los mutantes.

Según Kilgore (33) los patógenos en general no pueden persistir por largos períodos de tiempo en el follaje de las plantas, aparentemente debido a la acción de la luz solar y el viento.

Toumanoff (62) encontró en sus estudios que las conidias de hongos son incapaces de infestar insectos después de una exposición de tres horas a la luz solar. Estudios cualitativos han demostrado que la luz solar tiene un marcado efecto de inhibición de la tasa de crecimiento de los hongos debido a radiaciones de baja longitud de onda (54).

La importancia del uso de radiaciones en el campo del control biológico no está orientado sólo al combate de insectos como esterilización y liberación de machos, sino que pueden usarse para aumentar su resistencia a luz solar, de esta manera pueden persistir mayor tiempo en el campo y aumentar la patogenicidad de organismos que parasitan plagas.

2.6 Efecto de las Toxinas

Gabriel (19) trabajando con diferentes razas de Entomophthora coronata y tres especies de Entomophthora encontró intensa actividad enzimática en todas las especies de Entomophthora a los dos días de inoculado en diversos medios de cultivo con quitina. M. anisopliae muestra débil actividad enzimática en los medios de agar-quitina y agar quitina más leche sin grasa y agar nutritivo.

Praserphon y Tanada (43) trabajando con cuatro especies de Entomophthora spp. encontraron que en sólo dos especies, E. apiculata y E. coronata, el cultivo filtrado contiene micotoxinas que afectan por inyección en la sangre de la larva de G. mellonella. La presencia de micotoxinas está indicada por el ennegrecimiento de la sangre, inhibición de la metamorfosis y el desarrollo de la larva. Aparentemente el cultivo filtrado de E. thaxteriana y E. virulenta no contienen micotoxinas ya que las larvas inyectadas

desarrollaron los adultos y emergieron igual que en el testigo. E. coronata y E. apiculata producen micotoxinas en cultivos en reposo como en cultivos agitados, pero una dosis de 29,2 μ del filtrado de los cultivos en reposo no produjeron signos de ennegrecimiento y la misma dosis del filtrado de los cultivos agitados produjeron 90 por ciento de los síntomas señalados.

La micotoxina producida por estos dos hongos fue detectada después de 36 horas de cultivo, pero a las 24 horas de cultivo no se detectaron micotoxinas en los filtrados del cultivo. Además produjeron micotoxinas en los tres medios de cultivo ensayados.

Roberts (48), indujo parálisis en larvas de G. mellonella y B. mori, con inyecciones intrahemocélicas de cultivos filtrados de M. anisopliae, donde las larvas infestadas de B. mori sufrieron parálisis tetánica inmediatamente antes de la muerte. Roberts (47) encontró que las toxinas producidas por M. anisopliae producía parálisis tetánica en larvas de G. mellonella por inyección en el hemocelo. Este mismo autor (49) indica que las destruxinas A y B son dos péptidos tóxicos para insectos y están presentes en cultivos sumergidos de M. anisopliae. El hongo produce adicionalmente compuestos no identificados que produce parálisis tetánica en larvas de G. mellonella.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del Estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Programa de Energía Nuclear del IICA-CTEI, Turrialba, Costa Rica, en condiciones ambientales ordinarias.

3.2 Cultivo del Hongo

El hongo N. anisopliae, y sus mutantes, se cultivaron en tubos inclinados en un medio de cultivo denominado SDAY (Agar Sabouraud, dextrosa u extracto de levadura) (43, 48) y se incubaron bajo condiciones ambientales de laboratorio. La cosecha de esporas se realizó en seco aproximadamente un mes de sembrado los hongos. Se cosecharon estos tubos golpeando suavemente contra la esquina de una superficie de madera para que las esporas se desprendan del medio fácilmente, y se depositaran en el fondo del tubo; luego fueron transferidas a unos frascos estériles, secos y puestos en refrigeración a 4 C para conservarlos por el tiempo deseado.

Las suspensiones de esporas se prepararon pesando 0,5 g de esporas, añadiéndole 50 ml de agua destilada y estéril más una gota del dispersante Tritón X-100, estéril. Con el fin de obtener un buen grado de dispersión de las esporas, se licuó en un homogenizador Servall Omnimixer en marca de 100 del roestato, durante dos minutos. El estado de pureza, ausencia de grumos y separación de las esporas se comprobó por observación bajo el microscopio.

La concentración total de esporas fue determinada con un hemocitómetro, utilizando la dilución 10^{-2} de la concentración original de esporas. La viabilidad fue determinada por dilución y cultivo de las esporas en platos Petri en el mismo medio de cultivo, se

utilizaron diluciones de 10^{-5} y 10^{-6} . Este procedimiento de preparación de la suspensión de esporas fue normalizado para todos los experimentos.

3.3 Medios de Cultivo para Detectar Actividad Enzimática

El procedimiento usado para preparar los diferentes medios de cultivo consistió en preparar la composición por 100 ml de solución:

Solución A: NaNO_3 , 0,3 g; PO_4HK_2 , 0,1 g; SO_4Mg , 0,05 g; KCl , 0,05 g y FeSO_4 , 0,001 g.

Solución B: PO_4HK_2 , 0,1 g; SO_4Mg , 0,05 g; KCl , 0,05 g y SO_4Fe , 0,001 g.

Extracto acuoso de quitina: Se pesó 15 g de quitina (Matheson, Coleman & Bell), se puso a hervir durante 60 minutos en 300 ml de agua destilada, se licuó, finalmente se filtró y se obtuvo el extracto.

Quitina hervida, licuada y secada: Se utilizó la quitina retenida en el filtro y se puso en un desecador.

Descripción de los medios

Medio P-1: 50 ml de solución A
50 ml de extracto acuoso de quitina
2 g de bacto agar

Medio P-2: 50 ml de solución B
50 ml de extracto acuoso de quitina
2 g de bacto agar

Medio P-3: 100 ml de solución A
2 g de bacto agar

Medio P-4: 100 ml de solución B
2 g de bacto agar

Medio P-5: 100 ml de solución A
2 g de quitina
2 g de bacto agar

Medio P-6: 100 ml de solución B
2 g de quitina
2 g de bacto agar

Medio P-7: 100 ml de solución A
3 g de sacarosa
2 g de bacto agar

Medio P-8: 100 ml de solución B
3 g de sacarosa
2 g de bacto agar

Medio P-9: 100 ml de solución A
4 g de almidón de yuca
2 g de bacto agar

Medio P-10: 100 ml de solución B
4 g de almidón de yuca
2 g de bacto agar

También se preparó los siguientes medios de cultivo:

Medio P-11: 3,5 g Czapek Dox Brith (Difco) cuya composición por 100 ml de solución es igual a la solución A más 3 g de sacarosa
2 g de bacto agar

Medio P-12: 3,5 Czapek Dox
0,4 g amino ácidos (Vitamin-Free Casamino acids, Difco)
2 g de bacto agar

Medio P-13: 3,5 g Czapek Dox
 0,4 g de amino ácidos
 2 g de vitaminas (Nutritional Biochemical Corp.)
 2 g de bacto agar

Después de esterilizados los medios, se prepararon los platos Petri a temperatura ambiente y luego fueron inoculados con 1 ml de la suspensión de esporas de M. anisopliae y los mutantes en cada plato.

Los platos sembrados fueron colocados a la estufa a 30 C donde se incubaron y a partir del tercer día se hicieron observaciones durante 8 días, para ver el comportamiento de la actividad enzimática en los diferentes medios de cultivo, midiendo el área hidrolizada producida por las enzimas del hongo.

3.4 Cría del Insecto

Las larvas de H. grandella utilizadas en la realización del presente estudio fueron proveídas por el Departamento de Ciencias Forestales Tropicales del IICA-CTEI. Estas larvas fueron criadas en frascos de una onza con dieta artificial No. 12, cuya composición está en el Cuadro 1 (Apéndice), hasta la tercera parte del frasco (aproximadamente 10 g), poniendo dos larvas en cada uno de los frascos.

La dieta que se utilizó para criar las larvas, es una modificación de una dieta para Heliothis sp. suministrada por el Dr. M. J. Lukefahr, USDA, Brownsville, Texas, EE.UU. Conocida con la identificación de dieta No. 12, la composición está dada por Berríos (6) y Sterringa (59). Es la misma dieta que se utiliza en la cría artificial de esta plaga en el Laboratorio de Hypsipylam, técnica utilizada por Grijpma (22).

3.5 Selección de Larvas de *H. grandella* en Quinta Fase

Las larvas se seleccionaron por el tamaño de la cápsula cefálica comparándola con un patrón ya determinado, bajo el estereoscopio. Este patrón ha sido montado con cápsulas cefálicas de cada fase colectadas después de cada ecdisis, Figura 1.

3.6 Inoculación

La inoculación se llevó a cabo por inmersión de las larvas seleccionadas de quinta fase en grupos de 10, por el tiempo de un minuto, en una suspensión de esporas de concentración viable conocida. La suspensión de esporas preparada según indicación en sección 3.2.

3.7 Prueba de Patogenicidad de *M. anisopliae* y sus Mutantes

Se tomaron 300 larvas seleccionadas de acuerdo al tamaño de la cápsula cefálica de quinta fase, criadas en dieta artificial No. 12 y se dividieron en seis grupos de 50 larvas cada uno. Cada grupo fue tratado con una concentración de esporas viables conocida y el testigo con 50 ml de agua estéril más una gota de Tritón X-100 estéril.

Las larvas tratadas se colocaron individualmente en frascos de una onza con dieta artificial No. 12. Las observaciones fueron hechas a partir del tercer día hasta el noveno después del tratamiento, habiéndose llevado registro del número de larvas muertas por el hongo, número de larvas muertas naturales y número de larvas que llegaron a adulto. Para diferenciar las larvas muertas por el hongo, se pusieron en platos Petri con papel de filtro humedecido, donde se observó el desarrollo del micelio y esporulación del hongo.



Fig. 1 Cápsulas cefálicas de las seis fases de H. grandella colectadas después de cada ecdesis

Se trabajaron con las siguientes diluciones:

A = 0,5 g de esporas diluídas en 50 ml de agua estéril más
1 gota de Tritón X-100 estéril

B = 1/2 A

C = 1/10 A

D = 1/20 A

E = 1/40 A

F = testigo (50 ml agua estéril más 1 gota Tritón X-100 estéril)

3.7.1 Cálculo de la mortalidad

La mortalidad se calculó usando la fórmula de Abbott (1):

$$M = \frac{\text{Mortalidad en el tratamiento} - \text{Mortalidad en el testigo}}{\text{Sobrevivencia en el testigo}}$$

$$mt = mn + mH$$

$$Mt = \frac{mt}{n} \times 100$$

$$Mn = \frac{mn}{n} \times 100$$

$$MH = \frac{mH}{n} \times 100$$

$$Mt = Mn + MH$$

$$MH = Mt - Mn$$

Corrección de Abbott:

$$M = \frac{MH}{100 - Mn} = \frac{Mt - Mn}{100 - Mn}$$

$$M = \frac{\text{Mortalidad causada por el hongo}}{\text{Sobrevivencia en el testigo}}$$

donde:

mt = total larvas muertas

mH = larvas muertas por el hongo

mn = larvas muertas naturales (otras causas)

n = número de larvas tratadas

Mt = Mortalidad total en el tratamiento

MH = mortalidad por el hongo

M_n = mortalidad natural

$100 - M_n$ = sobrevivencia (por ciento) en el testigo

M = mortalidad corregida

3.7.2 Determinación de la concentración letal-50

La determinación de la CL_{50} se hizo por regresión simple utilizando la fórmula: $Y = a + b \ln C$

donde: Y = próbitas de mortalidad

C = concentración en millones de esporas viables /ml

Para esto se graficó la línea de regresión con los valores esperados y dados por la computadora del IICA-CTEI, expresando el porcentaje de mortalidad corregida por Abbott en próbitas como función del logaritmo de la concentración de esporas viables. Esto se realizó en cada uno de los mutantes independientemente.

3.8 Efecto de las Micotoxinas Producidas por el Hongo

Para esta prueba se preparó una suspensión de esporas como se indica en la sección 3.2. De esta suspensión de esporas se sembraron 2 ml en el medio líquido Sabouraud (dextrosa, 10 g; neo-peptona, 5 g; y extracto de levadura, 1 g en 500 ml de agua destilada). El medio de cultivo (96 ml) sembrado con las esporas se puso en un agitador de temperatura regulable (New Brunswick Gyrotory Shaker, modelo G 25) por 3, 6 y 9 días. Cumplido este tiempo de agitación indicado, se procedió a extraer la micotoxina de la siguiente manera: el cultivo de esporas se centrifugó durante 10 minutos en una centrífuga Servall Superspeed, en marca de 100 del roestato y el sobrenadante se pasó por un filtro Millipore de 0,8 micrones. De este filtrado se preparó diferentes diluciones ($A' = 10^0$; $B' = 1/2 \cdot 10^0$; $C' = 10^{-1}$ y $D' = 1/2 \cdot 10^{-1}$) y se mezcló 10 ml de cada

dilución con 90 ml de dieta No. 12, como testigo se usó 10 ml de agua destilada y estéril con 90 ml de dieta.

Para ver el efecto de la micotoxina mezclada con la dieta se tomaron 100 larvas seleccionadas de 3, 6 y 9 días de eclosionadas, criadas en dieta artificial No. 12 y se dividieron en cinco grupos de 20 larvas. Las larvas de cada grupo fueron puestas en frascos individuales de una onza con aproximadamente 10 g de la mezcla de las diferentes diluciones de micotoxina con la dieta.

Las observaciones fueron hechas a partir del tercer día hasta que las larvas lleguen al estado de adulto, habiéndose llevado registro del número de larvas muertas y el tiempo que tardan en llegar a adulto.

Todo este procedimiento se hizo con las micotoxinas de 3, 6 y 9 días de cultivado el hongo en el medio líquido Sabouraud, para cada uno de los mutantes y el tipo silvestre.

3.9 Efecto de las Radiaciones sobre la Capacidad de Formar Colonias

Para realizar las irradiaciones de cada uno de los mutantes y del tipo silvestre, se siguió la siguiente metodología: se tomaron 10 ml de la suspensión preparada pesando 0,5 g de esporas en 50 ml de agua destilada, estéril, más una gota de Tritón X-100, estéril y se pusieron en un plato Petri. Esta suspensión se mantuvo agitada durante el tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 17,5 ergios /mm²/seg de intensidad, sobre la superficie de un rotador Eberbach. Los tiempo de exposición a la luz empleados fueron de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20 y 21 minutos.

Para la irradiación se usó una lámpara germicida modelo G15T8, 15 Watt de la General Electric que emite la mayor parte de energía ultravioleta a una longitud de onda de 254 ~~nm~~.

Después de irradiar la suspensión se sembró en diferentes diluciones de acuerdo al tiempo de irradiación en platos con medio de cultivo SDAY. Estos platos sembrados con el hongo fueron colocados en una estufa a 30 C donde se incubaron y a los tres días se realizó el conteo de las esporas sobrevivientes que retuvieron la capacidad para formar colonias, con un contador de bacterias New Brunswick Scientific.

3.10 Corrección de la Evaporación de la Suspensión de Esporas en el Proceso de Irradiación

Para esta prueba se tomó 10 ml de agua destilada, estéril; se puso en un plato Petri y se siguió el procedimiento de irradiación empleado en la sección 3.8. Después de cada tiempo de irradiación se midió la cantidad de agua evaporada. Esta cantidad de agua evaporada en cada tiempo de irradiación se añadió a la suspensión de esporas para mantener la misma concentración de esporas.

4. RESULTADOS

4.1 Patogenicidad del Hongo *M. anisopliae* y sus Mutantes

Las larvas inoculadas fueron observadas a partir del tercer día, durante seis días. Todas las larvas muertas se pusieron en platos Petri con papel de filtro humedecido, donde se reconoció a las atacadas por su decoloración, turgidez y rigidez, y además porque a las 24 horas de muertas comenzó a emerger el micelio blanquecino a través de las pseudopatas y espiráculos, llegando a cubrir todo el cuerpo de la larva, tomando un color blanco uniforme a los tres días. El color blanco del micelio se presentó en el tipo silvestre y en los cuatro mutantes. Seguidamente al esporular el hongo el color de la larva cambia a verde oscuro en el caso del silvestre, a verde claro en el caso del mutante FB-6-2, a amarillo café en el caso de FB-7-3, a verde oscuro vinoso de FB-9-2 y a gris plateado en FB-13. Finalmente las larvas atacadas se transforman completamente en una masa de esporas que son fáciles de desintegrarse con un suave movimiento.

Los mutantes FB-6-2, FB-7-3 y FB-13 mantienen el color de sus esporas desarrolladas en el medio de cultivo sobre las larvas de prueba. Mientras que el mutante FB-9-2, cuyas esporas son de color verde oscuro vinoso en el medio de cultivo, sobre las larvas toman un color verde oscuro muy similar al color de las esporas del silvestre.

La mortalidad de las larvas tratadas se muestran en los Cuadros 1, 2, 3, 4 y 5, donde se aprecia que las larvas de *H. grandella* en la V fase son susceptibles a *M. anisopliae* tipo silvestre y a sus mutantes. Se ve también que más del 50 por ciento de las larvas fueron atacadas en la mayor concentración de esporas viables.

Cuadro 1. Mortalidad de larvas de H. grandella en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae

Esporas viables por ml	No. de larvas tratadas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	causas desconocidas	Larvas vivas	Porcentaje de mortalidad corregida	Pró-bi-tas
4,13x10 ⁸	50	30	28	2	20	59,58	5,23
2,06x10 ⁸	50	22	21	1	28	44,68	4,86
0,41x10 ⁸	50	20	19	1	30	40,43	4,75
0,20x10 ⁸	50	17	16	1	33	34,04	4,59
0,10x10 ⁸	50	17	15	2	33	31,91	4,53
0,05x10 ⁸	50	12	10	2	38	21,28	4,20
0	50	2	0	2	48	0,00	-

Cuadro 2. Mortalidad de larvas de H. grandella en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae FB-7-3

Esporas viables por ml	No. de larvas tratadas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	causas desconocidas	Larvas vivas	Porcentaje de mortalidad corregida	Pró-bi-tas
2,71x10 ⁸	50	32	30	2	18	65,22	5,40
1,35x10 ⁸	50	28	25	3	22	54,35	5,10
0,27x10 ⁸	50	21	19	2	29	41,30	4,77
0,13x10 ⁸	50	18	15	3	32	32,64	4,54
0,07x10 ⁸	50	9	7	2	41	15,22	3,95
0	50	4	0	4	46	0,00	-

Cuadro 3. Mortalidad de larvas de H. grandella en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae FB-9-2

Esporas viables por ml	No. de larvas tratadas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	causas desconocidas	Larvas vivas	Porcentaje de mortalidad corregida	Pró-bi-tas
7,68x10 ⁷	50	32	29	3	18	61,70	5,25
3,84x10 ⁷	50	25	23	2	25	48,95	4,98
0,76x10 ⁷	50	19	18	1	31	38,29	4,70
0,38x10 ⁷	50	11	10	1	39	21,28	4,19
0,19x10 ⁷	50	11	8	3	39	17,02	4,05
0	50	3	0	3	47	0,00	-

Cuadro 4. Mortalidad de larvas de H. grandella en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae FB-13

Esporas viables por ml	No. de larvas tratadas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	Larvas muertas por causas desconocidas	Larvas vivas	Porcentaje de mortalidad corregidas	Probabilidades
$3,35 \times 10^8$	50	33	32	1	17	68,09	5,55
$1,68 \times 10^8$	50	19	19	0	31	40,43	5,05
$0,33 \times 10^8$	50	12	12	0	38	25,53	4,78
$0,16 \times 10^8$	50	13	11	2	37	23,40	4,68
$0,08 \times 10^8$	50	14	10	4	36	21,28	4,36
0	50	3	0	3	47	0,00	-

Cuadro 5. Mortalidad de larvas de H. grandella en V fase a los 9 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae FB-6-2

Esporas viables por ml	No. de larvas tratadas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	Larvas muertas por causas desconocidas	Larvas vivas	Porcentaje de mortalidad corregidas	Probabilidades
$2,53 \times 10^8$	50	36	34	2	14	70,83	5,50
$1,27 \times 10^8$	50	25	24	1	26	52,17	5,05
$0,25 \times 10^8$	50	19	18	1	36	39,13	4,78
$0,12 \times 10^8$	50	22	17	5	33	36,90	4,68
$0,06 \times 10^8$	50	17	12	5	38	26,09	4,36
0	50	4	0	4	46	0,00	-

Las larvas muertas por causas desconocidas tienen un bajo porcentaje y posiblemente se deba en algunos casos a contaminación de la dieta y a daños físicos en el manipuleo de las larvas. Este número similar en todos los tratamientos y en el testigo, indica que el porcentaje de mortalidad por causas que no es el hongo es una mortalidad normal que ocurre en cada tratamiento.

La tendencia de los resultados de mortalidad de larvas causadas por diferentes concentraciones de esporas de M. anisopliae y de los cuatro mutantes se ve más claramente en las Figuras 2, 3, 4, 5 y 6.

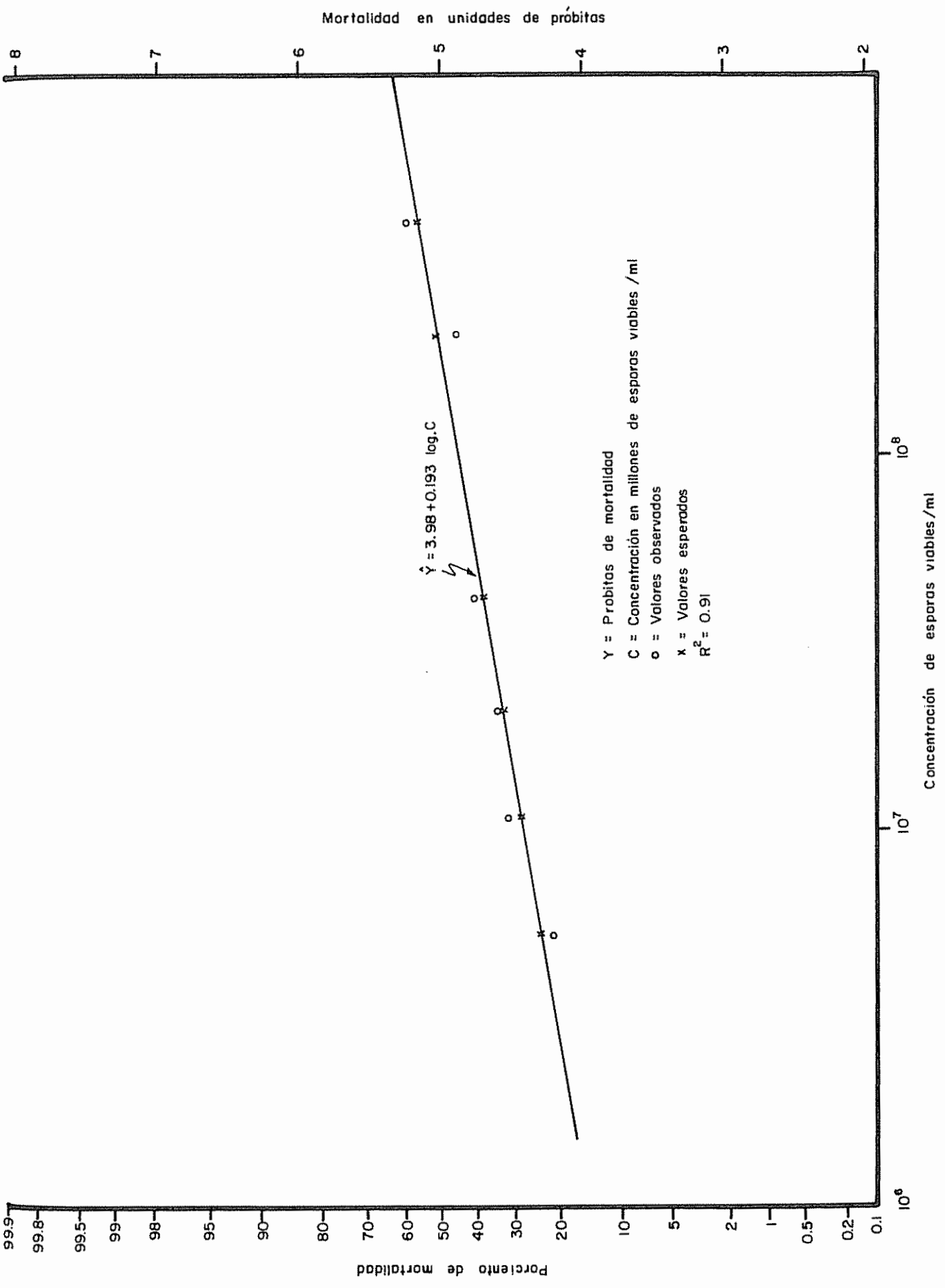


Fig. 2 Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de M. anisopliae sobre larvas de H. grandella

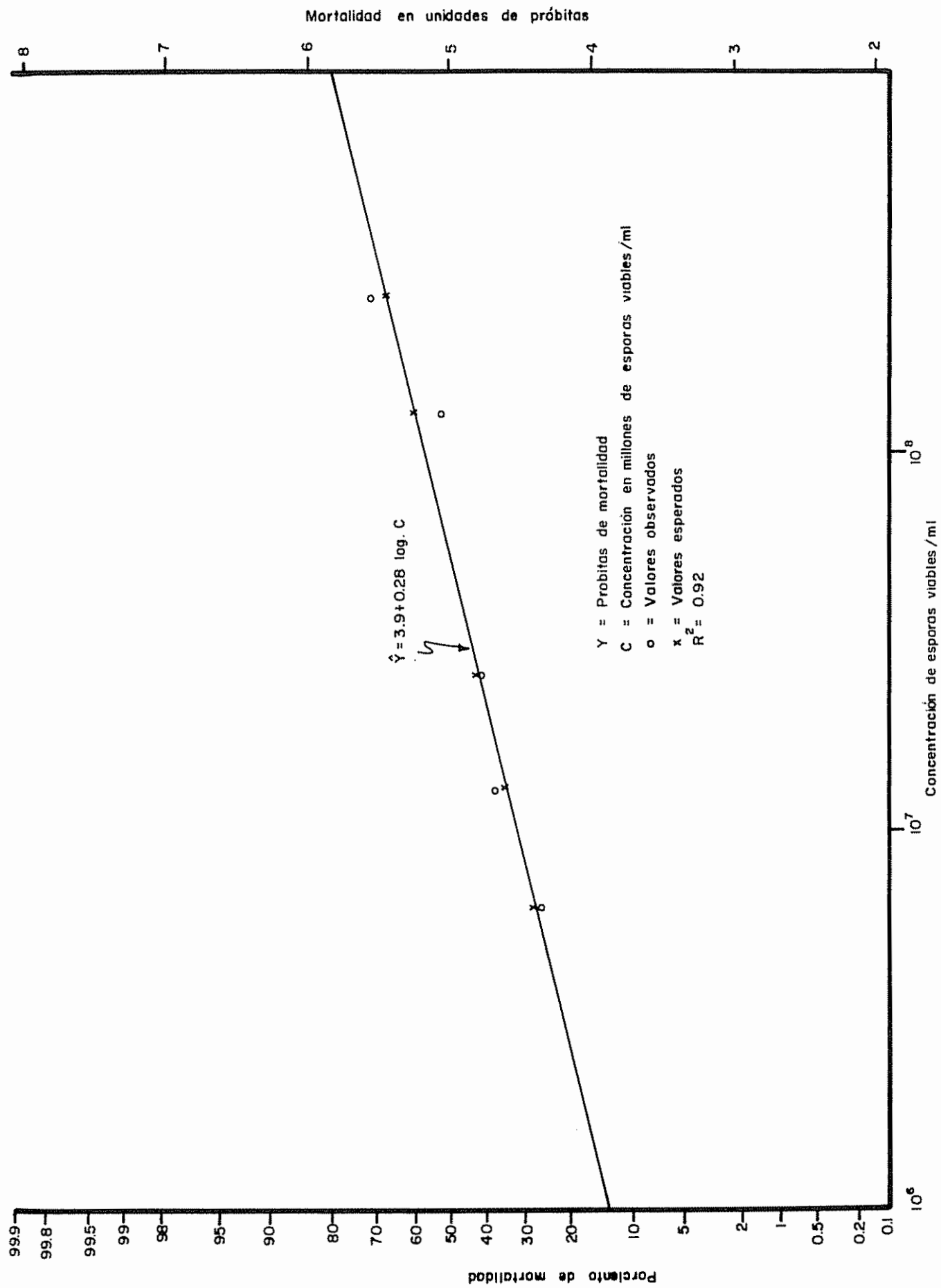


Fig. 3 Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de *M. anisopliae* F B-6-2 sobre larvas de V fase de *H. grandella*

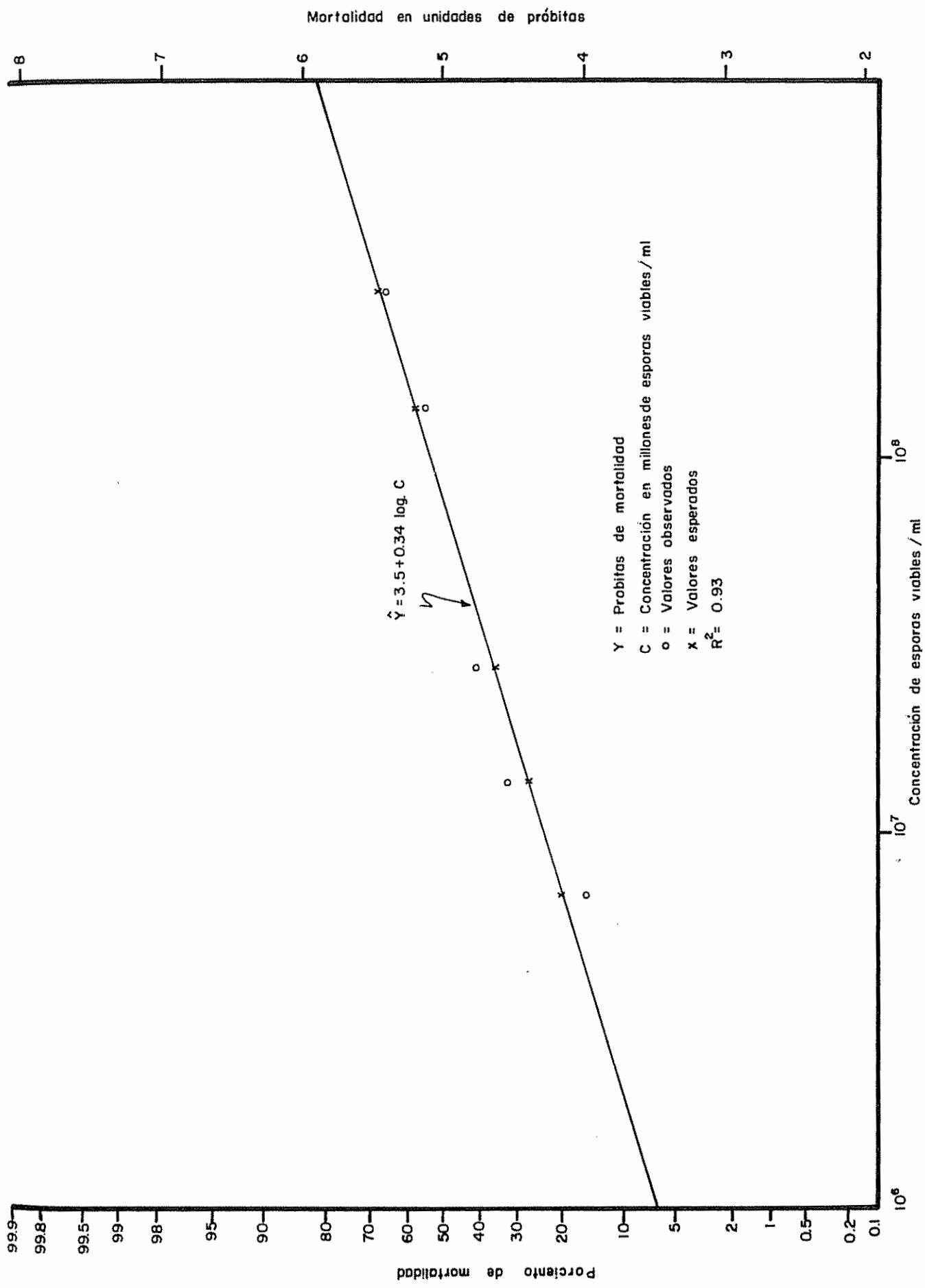


Fig. 4 Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de *M. anisoplaie* FB-7-3 sobre larvas de V fase de *H. grandella*

Mortalidad en unidades de próbitas

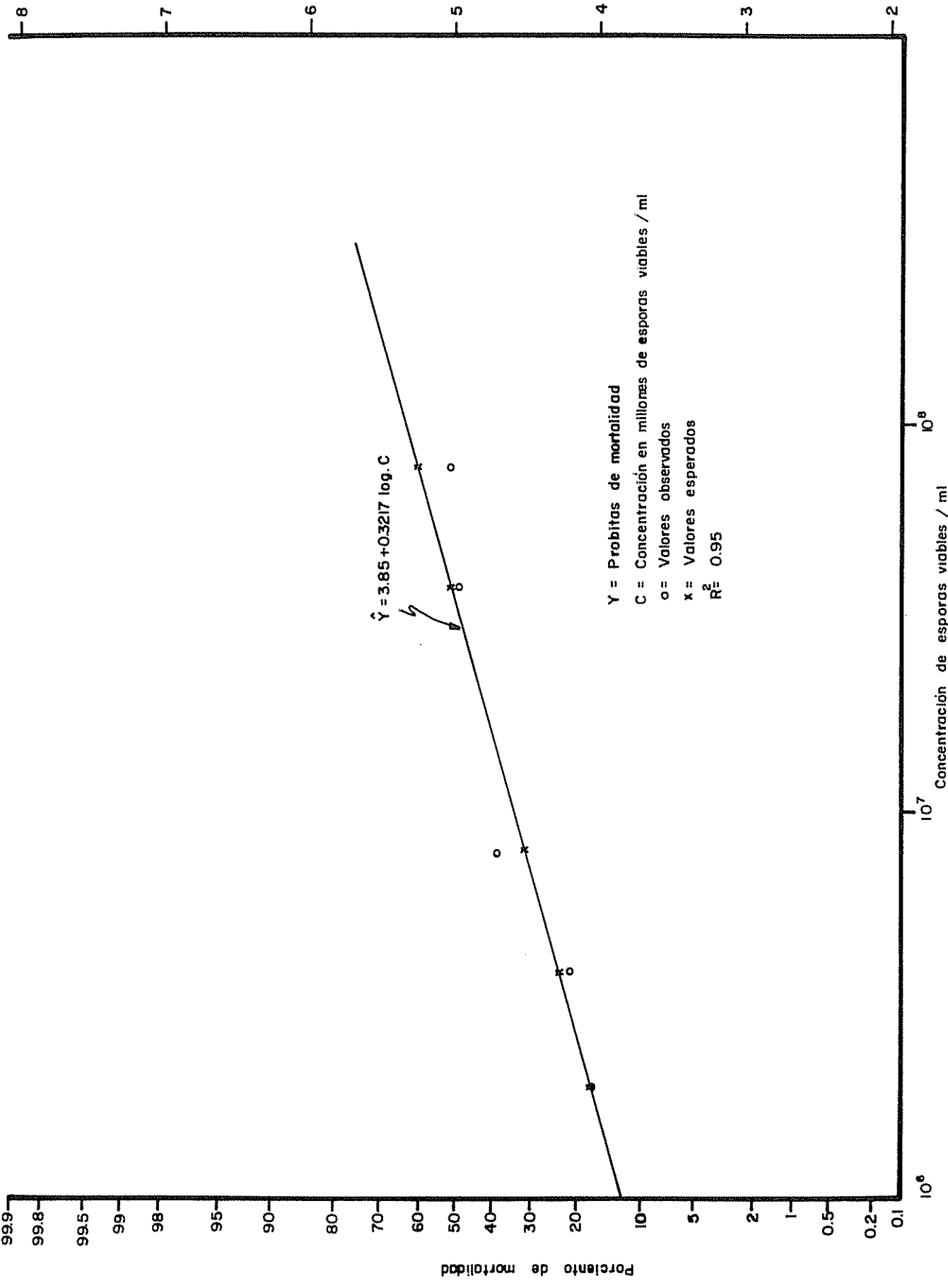


Fig. 5 Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de *M. anisopline* FB-9-2 sobre larvas de V fase de *H. grandella*.

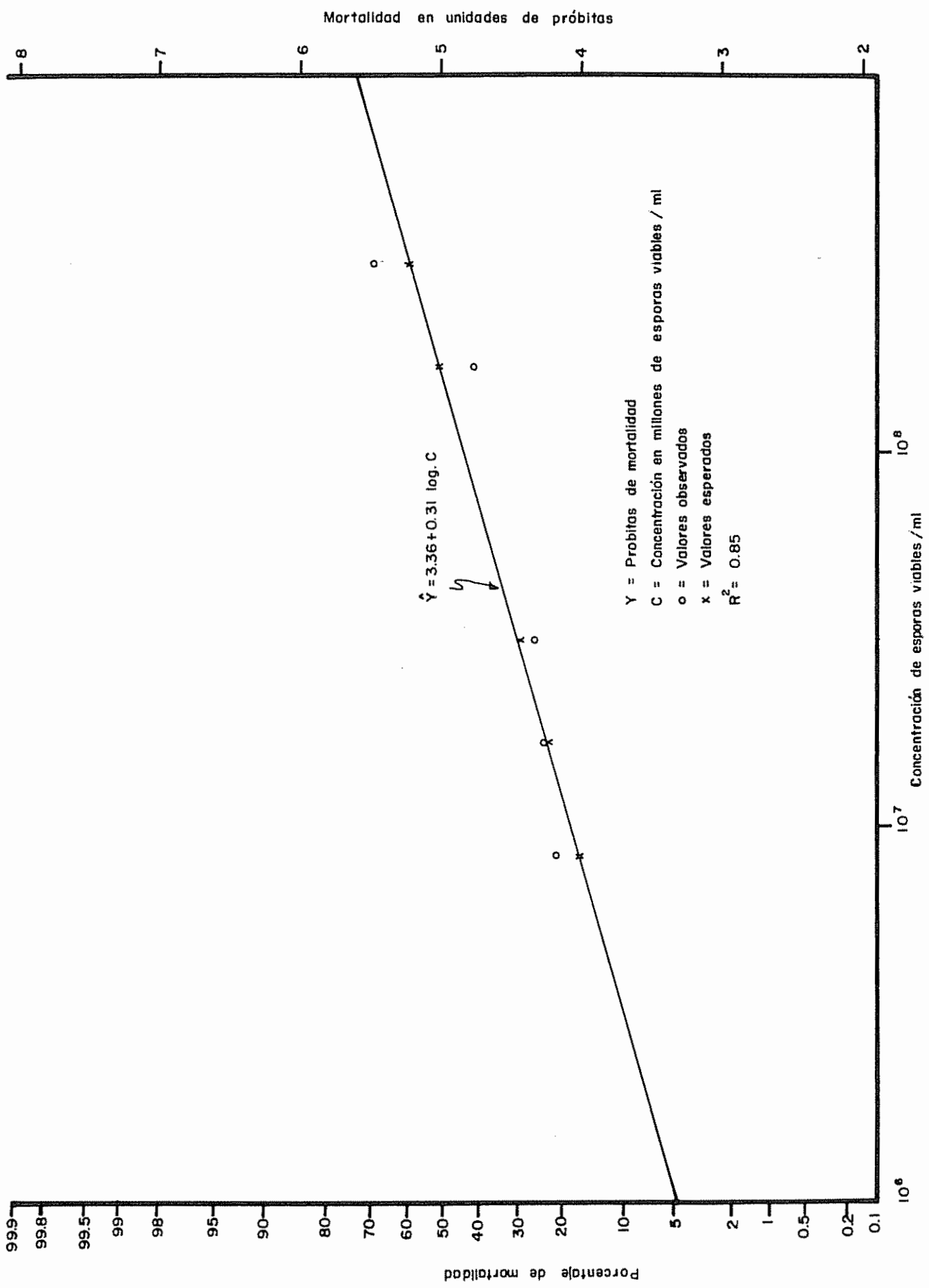


Fig. 6 Línea de regresión calculada para los valores de dosis mortalidad de *M. anisopliae* FB-13 sobre larvas de V fase de *H. grandella*

Las líneas de regresión y el R^2 calculados para los valores de dosis mortalidad de M. anisopliae y de los cuatro mutantes sobre las larvas de V fase de H. grandella están dados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de las ecuaciones de regresión y R^2 de la dosis mortalidad de M. anisopliae y sus mutantes sobre larvas de V fase de H. grandella.

<u>M. anisopliae</u>	Ecuación de Regresión	R^2
Silvestre	$Y = 3,98 - 0,193 \ln C$	0,91
FB-7-3	$Y = 3,5 - 0,34 \ln C$	0,93
FB-9-2	$Y = 3,85 - 0,322 \ln C$	0,95
FB-13	$Y = 3,36 - 0,31 \ln C$	0,85
FB-6-2	$Y = 3,9 - 0,28 \ln C$	0,92

Los límites de confianza al 95 por ciento para los valores de las pendientes están dados en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Límites de confianza al 95 por ciento de los valores de las pendientes de M. anisopliae y de los cuatro mutantes

<u>M. anisopliae</u>	Pendiente	Límites de confianza al 95%	
		Superior	Inferior
Silvestre	0,19358	0,33798	0,04923
FB-7-3	0,34133	0,52815	0,15451
FB-9-2	0,32171	0,54228	0,10114
FB-13	0,31650	0,50177	0,13123
FB-6-2	0,27731	0,47864	0,07598

Las dosis calculadas de esporas viables por ml necesarias para obtener el 50 por ciento de mortalidad (CL) están dados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Número de esporas viables/ml de M. anisopliae requeridas para producir 50 por ciento de mortalidad en la V fase de H. grandella

<u>M. anisopliae</u>	Concentración de esporas viables/ml
Silvestre	$19,2 \times 10^7$
FB-7-3	$7,98 \times 10^7$
FB-9-2	$3,45 \times 10^7$
FB-13	$17,6 \times 10^7$
FB-6-2	$5,51 \times 10^7$

Se puede apreciar que el mutante FB-9-2 requiere menos cantidad de esporas por unidad de volumen para producir el 50 por ciento de mortalidad y el silvestre requiere concentración más alta de esporas para causar el 50 por ciento de mortalidad. El valor de CL_{50} es la medida cuantitativa más comunmente usada para expresar la patogenicidad relativa de un patógeno sobre un hospedante determinado.

4.2 Efecto de las Radiaciones sobre la Capacidad para Formar Colonias en Esporas de *M. anisopliae* y sus Mutantes

Los resultados de estas pruebas están dados en las Figuras 7 y 8 donde se aprecia la reducción de la viabilidad producida por el aumento del tiempo de irradiación en la suspensión acuosa de esporas. Se observa una gran variación en susceptibilidad dentro de cada mutante y el silvestre debido a la influencia de la edad de las esporas y a las características genéticas de cada uno. En el Cuadro 9 se compara la sobrevivencia de los mutantes con el tipo silvestre a una dosis de irradiación baja y a una dosis alta. Se puede observar que con esporas de 60 días de edad a una dosis de 84×10^3 ergios/mm² la sobrevivencia de *M. anisopliae* y sus mutantes FB-9-2 y FB-7-3 es parecida, y que los mutantes FB-13 y FB-6-2 tienen una sobrevivencia de 10^3 y 10^4 veces más baja. A una dosis de 168×10^3 ergios/mm² solamente el mutante FB-9-2 muestra mayor resistencia que el tipo silvestre y los otros mayor sensibilidad. Estos datos indican que de los mutantes seleccionados sólo la cepa FB-9-2 se puede considerar más resistente a la luz ultravioleta que el tipo silvestre.

En el Cuadro 10 se puede apreciar que con esporas de 90 días de recolectadas y almacenadas a 4 C la sobrevivencia del mutante

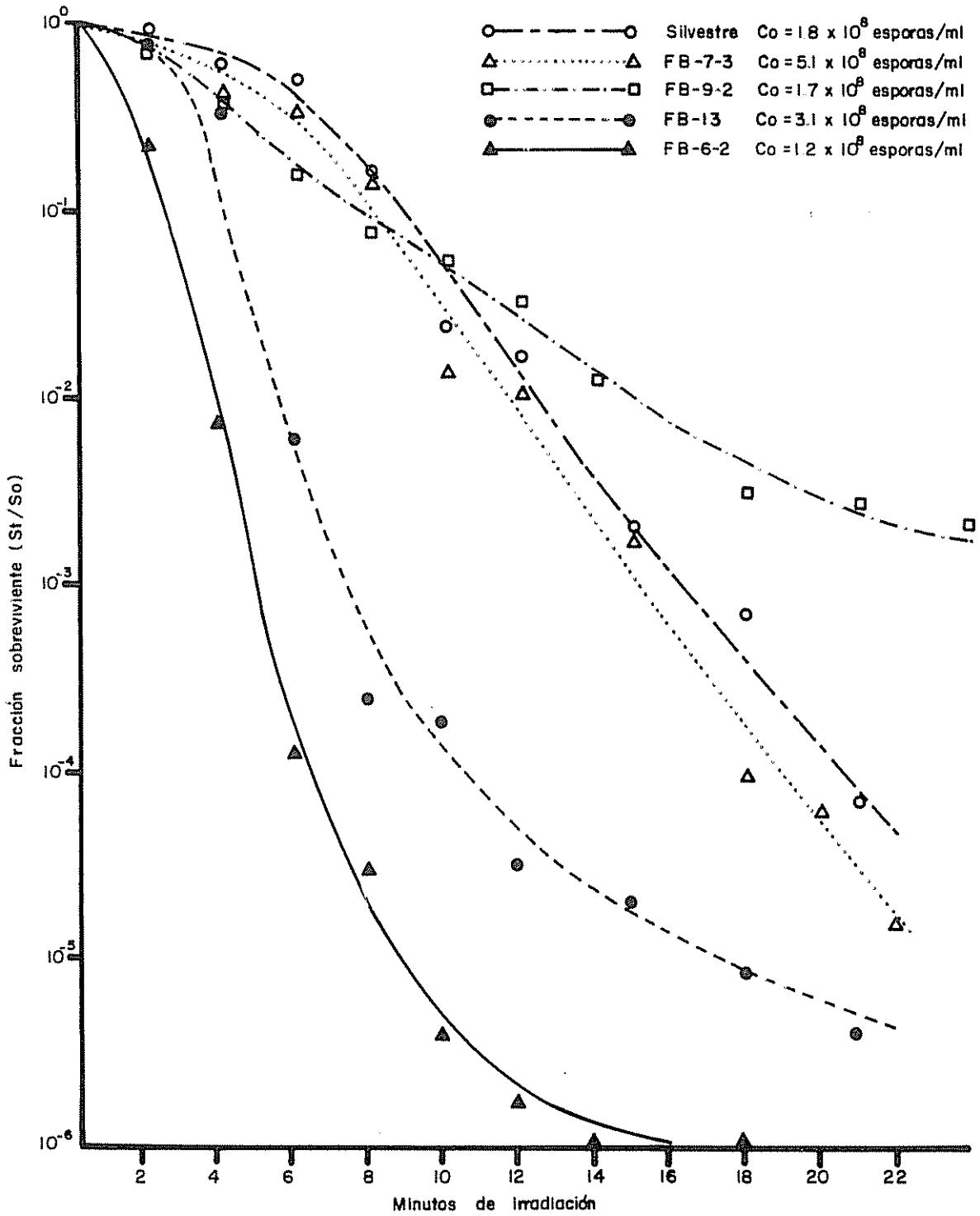


Fig 7 Capacidad relativa de las esporas de *M. anisopliae* y sus mutantes para formar colonias, después de irradiados con luz ultravioleta 254 nm ($I = 17.5$ ergios/mm²/seg) a los 60 días de edad

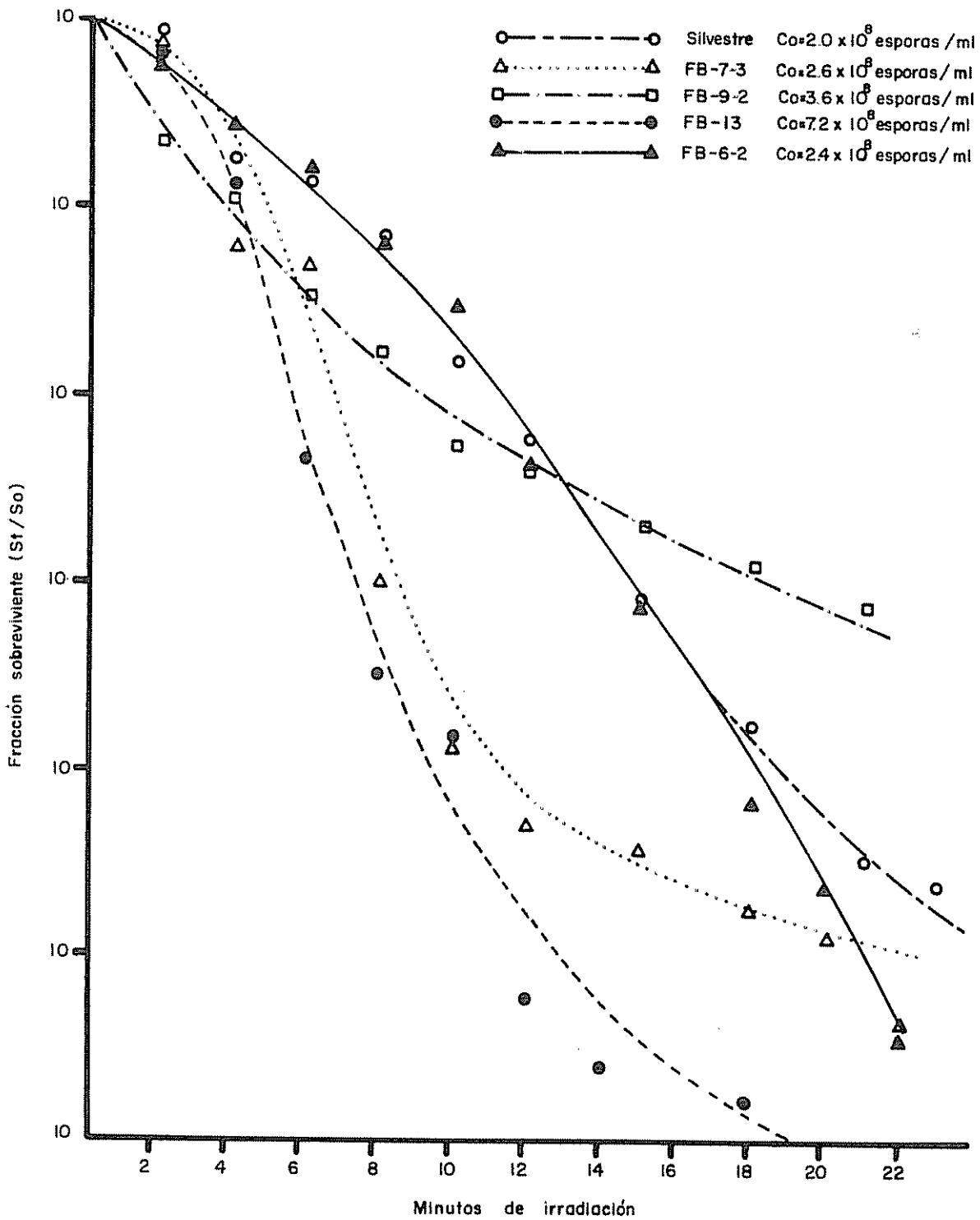


Fig. 8 Capacidad relativa de las esporas de *M. anisopliae* y sus mutantes para formar colonias, después de irradiadas con luz ultravioleta 254 nm ($I_{\lambda} = 17.5$ ergios/mm²/seg) a los 90 días de edad

Cuadro 9. Fracción sobreviviente de esporas de 60 días de edad, almacenadas a 4 C de M. anisopliae y sus mutantes a una dosis baja y alta de irradiación ultravioleta 254 nm

Dosis de irradiación	Silvestre	FB-9-2	FB-7-3	FB-13	FB-6-2
Fracción sobreviviente					
84×10^3 ergios /mm ²	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$5,5 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$
168×10^3 ergios /mm ²	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$
Sobrevivencia relativa al silvestre					
84×10^3 ergios /mm ²	1	$9,1 \times 10^{-1}$	$9,1 \times 10^{-1}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-4}$
168×10^3 ergios /mm ²	1	6,3	$5,4 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-4}$

Cuadro 10. Fracción sobreviviente de esporas de 90 días de edad, almacenadas a 4 C de M. anisopliae y sus mutantes a una dosis alta y baja de irradiación ultravioleta 254 nm

Dosis de irradiación	silvestre	FB-9-2	FB-7-3	FB-13	FB-6-2
Fracción sobreviviente					
84×10^3 ergios /mm ²	$5,6 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-2}$
168×10^3 ergios /mm ²	$4,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-4}$
Sobrevivencia relativa al silvestre					
84×10^3 ergios /mm ²	1	$2,8 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$8,6 \times 10^{-3}$	1
168×10^3 ergios /mm ²	1	3,3	$5,7 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-3}$	1

FB-6-2 es igual a la del tipo silvestre a la dosis baja (84×10^3 ergios/mm²) y a dosis alta (168×10^3 ergios/mm²). El mutante FB-9-2 muestra un poco menor resistencia a dosis baja pero cerca de tres veces más sobrevivencia a dosis alta.

Los mutantes FB-13 y FB-7-3 muestran mucho menor sobrevivencia a ambas dosis.

Si analizamos el efecto del almacenamiento sobre la resistencia de las esporas a la radiación ultravioleta podemos observar que el mutante FB-9-2 conserva su resistibilidad, el mutante FB-6-2 muestra un incremento considerable en su resistencia hasta el punto de igualar al tipo silvestre, el mutante FB-7-3 sin embargo muestra el fenómeno contrario, es decir, se vuelve más radiosensitivo que el silvestre a medida que aumenta la edad de las esporas, mientras que el mutante FB-13 siguió siendo el más susceptible a la radiación aún después del almacenamiento.

4.3 Prueba de Corrección de Evaporación de la Suspensión de Esporas en Proceso de Irradiación

El resultado de esta prueba está en la Figura 9 donde se aprecia la cantidad de agua evaporada en el transcurso de la irradiación. Llegando a evaporarse en 21 minutos casi el 10 por ciento de la cantidad inicial del líquido.

En la Figura 10 se observa una prueba con el mutante FB-13 donde se compara una curva de la capacidad de formar colonias, realizada siguiendo el método de irradiación ya descrito en la sección 3,2 con otra curva de la misma concentración pero añadiéndole la cantidad de agua evaporada, ya determinada según prueba de evaporación de la suspensión de esporas. Donde se confirma que en el proceso de irradiación hay evaporación pero que ésta sólo altera ligeramente la concentración de esporas en los últimos minutos de irradiación, porque al seguir tomando para irradiar la misma cantidad de suspensión de esporas que ha perdido agua, se está tomando mayor número de esporas.

4.4 Actividad Enzimática

El método utilizado no sirvió para detectar la actividad enzimática de las cepas estudiadas.

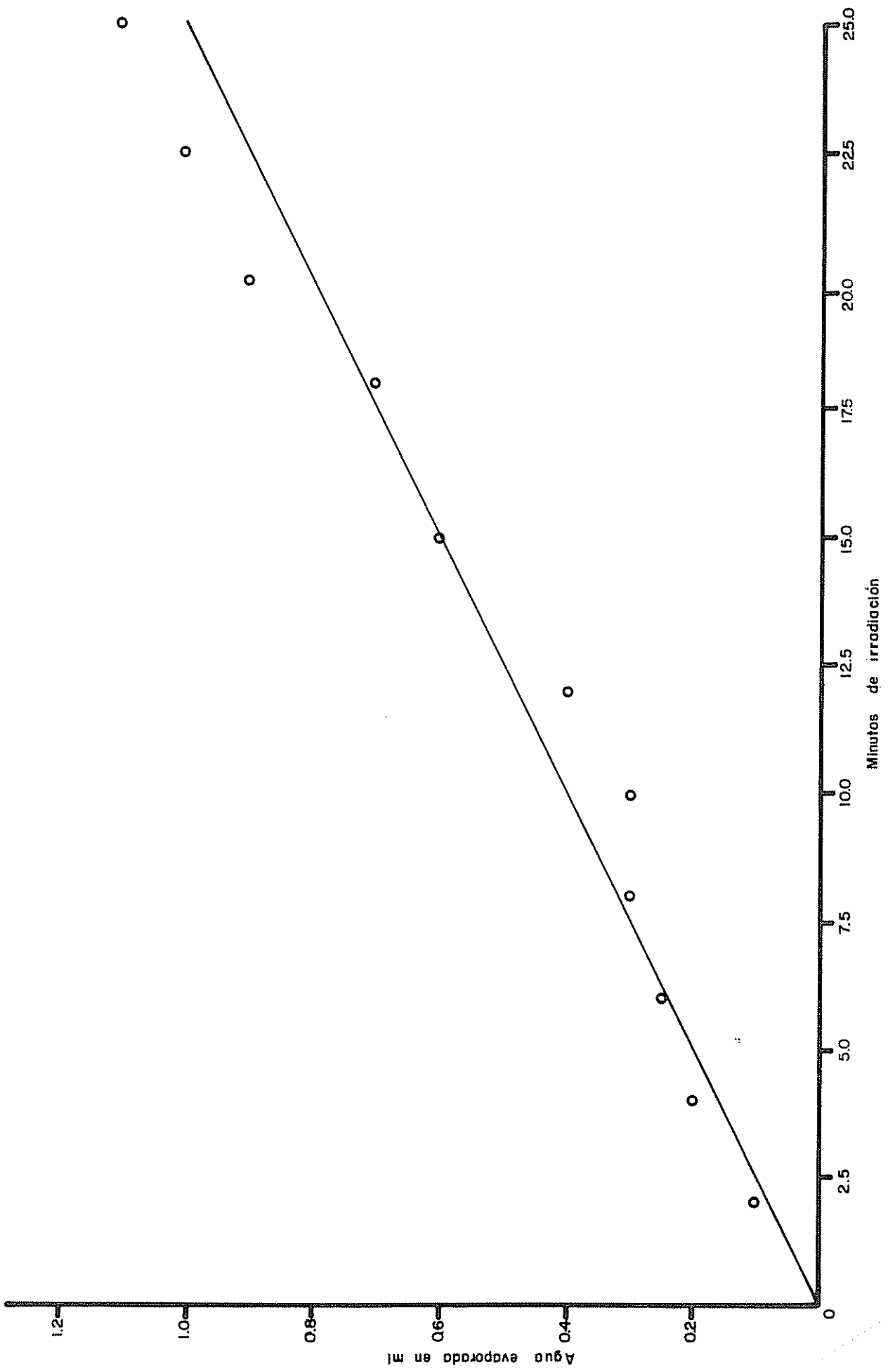


Fig. 9 Evaporación de agua en el proceso de irradiación ultravioleta 254 nm (I_p 17.5 ergios/mm²/seg)

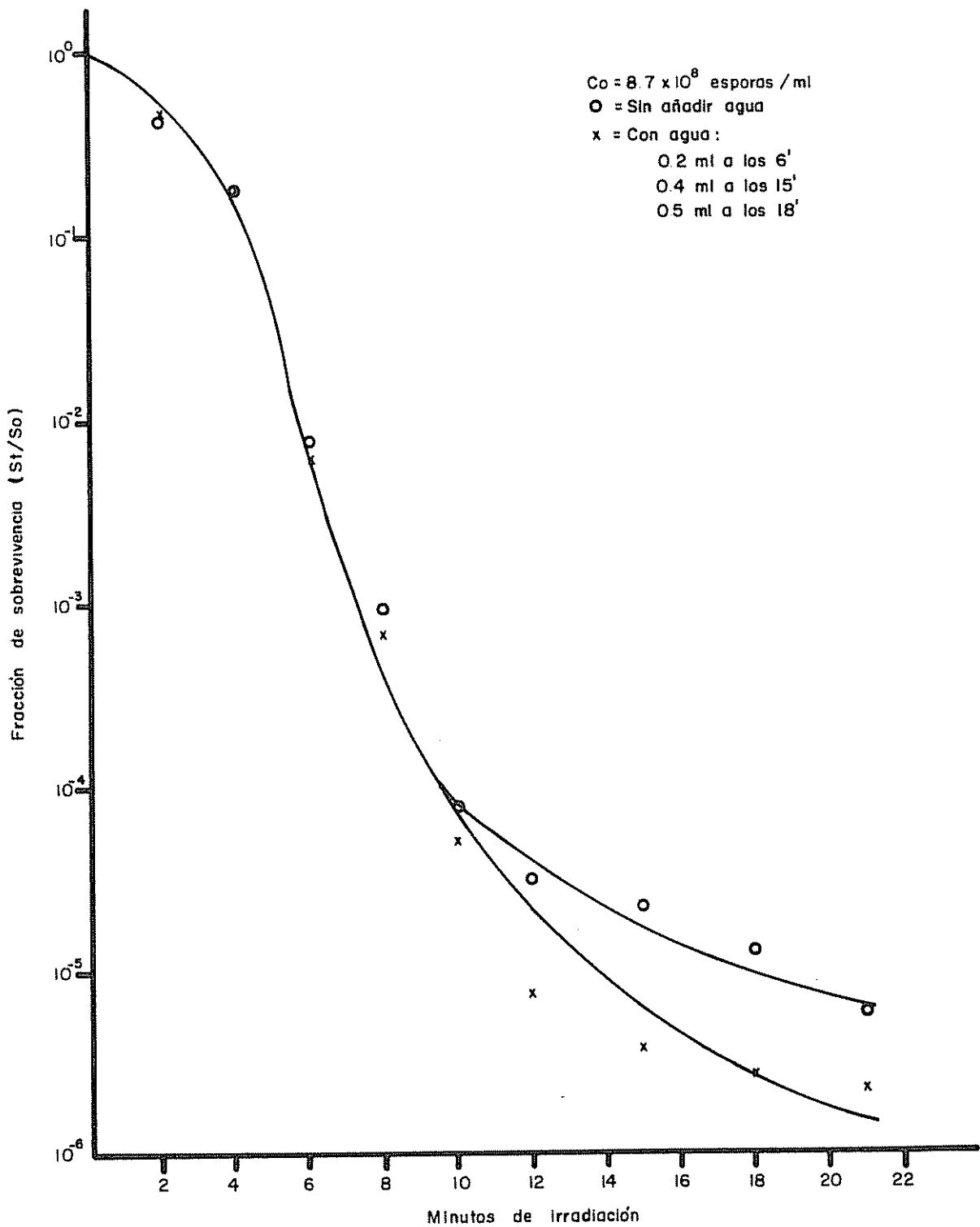


Fig. 10 Capacidad relativa de formar colonias de las esporas de *M. anisopliae* FB-13, añadiéndole cantidad de agua evaporado según figura 9 en el proceso de irradiación ultravioleta 254 nm

4.4.1 Efecto de la actividad de las toxinas producidas en el desarrollo del hongo en el medio líquido SDAY

Al desarrollar M. anisopliae y los cuatro mutantes en el medio líquido produjeron sustancias tóxicas cuya actividad se manifestó produciendo en las larvas de H. grandella inhibición en el desarrollo, por lo tanto, un alargamiento del ciclo de vida; pérdida de movimiento y muerte de la larva, aunque en porcentaje bajo. Las larvas muertas por la micotoxina se reconocieron por su ennegrecimiento en comparación a las muertas en el testigo.

En la Figura 11 se muestra la diferencia de tamaño entre las larvas de H. grandella criadas sobre dieta No. 12 mezclada con diferentes diluciones de micotoxina producida a los tres días de cultivado en medio líquido, agitado. La misma diferencia de tamaño se observó en las larvas puestas en dieta con micotoxina de los mutantes y también con las micotoxinas producidas a los seis y nueve días de cultivado en medio líquido, agitado.

Los resultados de los experimentos con micotoxinas producidas por las cepas estudiadas a los 3, 6 y 9 días de incubación en medio líquido agitado, sobre la pupación a los 28 días de larvas de H. grandella están dados en Cuadro 11. Se puede apreciar que más del 80 por ciento de todas las larvas del testigo empuparon a los 28 días.

El tipo silvestre empieza a producir toxinas en los tres primeros días de incubación, alcanzando el máximo a los 6 días. Después de 6 días la toxina aparentemente empieza a perder efectividad.

El mutante FB-7-3 empieza a producir toxinas después de tres días de incubación y también pierde efectividad después de 6 días de incubación.

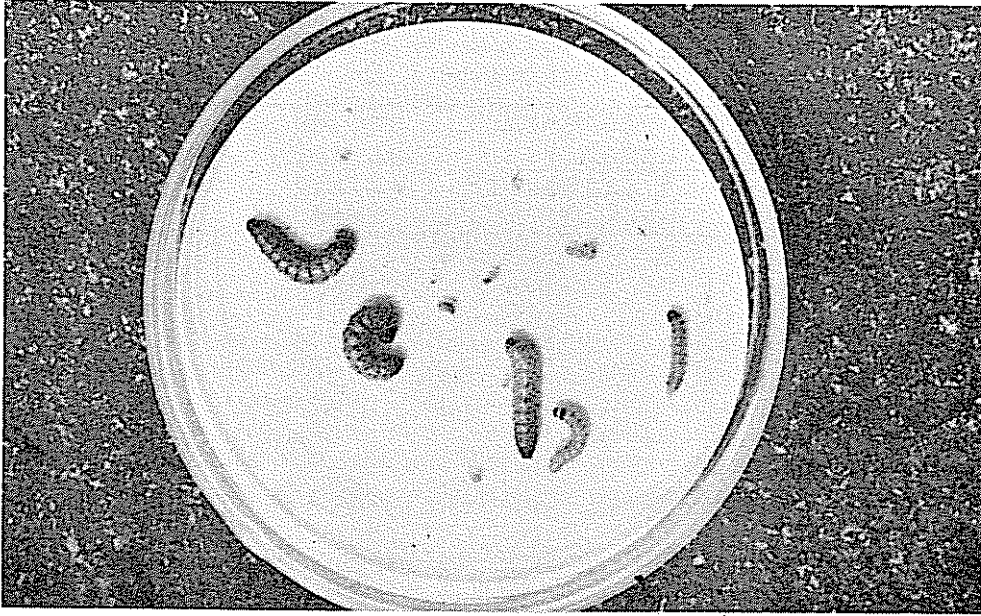


Fig. II Efecto de la ingestión de las toxinas producidas por *M. anisopliae* silvestre sobre el desarrollo de las larvas de *H. grandella*. La larva de la izquierda es la del testigo y las de la derecha muestran efecto del aumento en la concentración de toxinas

Los mutantes FB-13 y FB-9-2 empiezan a producir toxinas después de los 6 días de incubación y en cantidades relativamente pequeñas como lo muestra la poca reducción en el porcentaje de pupación.

Cuadro 11. Efecto de las toxinas producidas por M. anisopliae silvestre y sus mutantes, incubados en medio líquido SDAY por tres períodos diferentes, sobre el porcentaje de pupación de larvas de H. grandella a los 28 días después del tratamiento

Edad del cultivo en días	Tratamientos*	No. de larvas tratadas	Porcentaje de pupación a los 28 días después del tratamiento				
			Silvestre	FB-7-3	FB-9-2	FB-13	FB-6-2
3	A'	20	0	95	85	85	75
	B'	20	30	90	95	90	95
	C'	20	85	95	90	95	85
	D'	20	95	95	90	80	90
	T	20	95	95	95	95	95
6	A'	20	0	0	80	90	0
	B'	20	0	0	90	80	15
	C'	20	0	0	90	75	40
	D'	20	60	15	90	80	45
	T	20	80	95	95	95	80
9	A'	20	0	10	65	60	65
	B'	20	20	15	75	90	70
	C'	20	95	85	90	90	90
	D'	20	95	95	95	100	95
	T	20	90	100	100	100	90

* Los tratamientos están descritos en la sección de materiales y métodos.

El mutante FB-6-2 al igual que el mutante FB-7-3 empieza a producir toxinas después de los tres días de incubación, sin embargo, la cantidad excretada por FB-7-3 parece ser mucho mayor que la de FB-6-2.

En términos generales al observar el efecto de las toxinas sobre la pupación podemos decir, que el mutante FB-7-3 es el más efectivo de todas las cepas estudiadas y los mutantes FB-9-2 y FB-13 son los menos efectivos.

El efecto de las toxinas sobre la mortalidad de larvas se ve en el Cuadro 12. Se observa que las toxinas producidas por los mutantes FB-13 y FB-9-2 causan baja mortalidad (5 a 10 por ciento) de las larvas, la mayoría de las larvas que no mueren logran empupar.

Las toxinas del mutante FB-6-2 causaron del 5 al 25 por ciento de mortalidad con las mayores concentraciones usadas, no habiendo diferencia significativa con el período de incubación del hongo.

Las mortalidades causadas por el tipo silvestre y el mutante FB-7-3 pueden alcanzar hasta un 90 por ciento con la mayor concentración usada. Esto significa que el efecto de las toxinas producidas por el tipo silvestre y el mutante FB-7-3 sobre la pupación mostrada en el Cuadro 11, se debe a la mortalidad de las larvas, mientras que el efecto de las toxinas producidas por los otros mutantes sobre la pupación se debe a una inhibición en el desarrollo de las larvas. A pesar de su crecimiento lento estas larvas logran empupar y dan origen a adultos visiblemente no defectuosos después de un período normal de pupación.

Cuadro 12. Efecto de las toxinas producidas por M. anisopliae silvestre y sus mutantes, incubados por tres períodos diferentes en medio líquido SDAY, sobre el porcentaje de mortalidad total de larvas de H. grandella

Edad del cultivo en días	Tratamiento*	No. de larvas tratadas	Porcentaje de mortalidad total de larvas				
			Silvestre	FB-7-3	FB-9-2	FB-13	FB-6-3
3	A'	20	60	5	15	10	15
	B'	20	40	10	5	0	5
	C'	20	10	5	10	5	10
	D'	20	5	5	5	15	5
	T	20	5	5	5	5	5
6	A'	20	80	90	20	15	25
	B'	20	50	80	10	5	25
	C'	20	10	60	10	5	20
	D'	20	20	35	10	10	5
	T	20	5	5	5	5	5
9	A'	20	45	5	20	5	5
	B'	20	35	10	15	0	10
	C'	20	0	10	0	10	10
	D'	20	0	5	0	0	5
	T	20	5	5	0	0	5

* Los tratamientos están descritos en la sección de materiales y métodos.

5. DISCUSION

Las pruebas de patogenicidad se hicieron sobre la V fase de H. grandella, por ser ésta la más susceptible al ataque del hongo (6) y en efecto se encontró que los mutantes y el silvestre dieron una mortalidad superior al 50 por ciento. Berríos (6) trabajando con el hongo M. anisopliae sobre larvas de H. grandella encontró que las fases V, VI, VII presentan mayor susceptibilidad que las primeras fases, estando de acuerdo con la regla de que las larvas de mayor edad son las más susceptibles (33). La susceptibilidad de las últimas fases y en especial de la V fase ha sido probada en varios experimentos y con varios patógenos. Miyajina y Kawase (39) utilizan la V fase de Bombyx mori al probar la acción patogénica de la polihedrosis nuclear. Morris (41) estudiando el efecto de la luz solar, radiaciones y temperatura sobre la capacidad patogénica del virus utilizó también la V fase de Lambdina fiscellaria lugubrosa.

En los resultados de las pruebas de patogenicidad de los mutantes y del silvestre, la presencia de la enfermedad fue clara. Los síntomas que presentan las larvas atacadas son similares a los descritos en larvas de H. grandella por Berríos (6), en Scutigrella immaculata según Steinhaus (58) y en larvas de varias especies de insectos según Getzen y Shanks (21).

La mayor mortalidad se produjo entre los tres y nueve días de inoculadas las larvas. Después del noveno día las larvas tratadas que no murieron llegaron al estado de pupa y posteriormente al estado de adulto, siendo el período máximo de mortalidad a los seis días. Estos datos coinciden con los observados por Berríos (6), Nadelin (35) y Getzin y Shanks (21).

La mortalidad observada en los cuatro mutantes es superior a la del silvestre, ya que la CL_{50} de éste requiere mayor concentración de esporas para producir el 50 por ciento de mortalidad. El más patógeno es el mutante FB-9-2, seguido del mutante FB-6-2. Esto indica que las características de patogenicidad, en este caso, característica deseada y buscada de M. anisopliae ha sido mejorada como consecuencia de un cambio hereditario inducido mediante la irradiación gamma. Stakman y Harrar (57) indican que las mutaciones que afectan características culturales como el color, la topografía y consistencia de las colonias son comunes. Como mutaciones de características fisiológicas cita la producción de enzimas, la reacción a sustancias tóxicas, las exigencias de temperatura. El proceso se observa a menudo en los caracteres morfológicos y principalmente en la forma, tamaño y color, órganos de frutificación y formas de resistencia. También es común la mutación en el vigor sexual y en la patogenicidad. El número y las clases de mutantes producidos en patógenos tales como Ustilago maydis y Helminthosporium sativum es innumerable.

Esser y Kuener (16) citan muchos trabajos sobre mutaciones producidas con rayos X como los de Stapleton et al. 1952, y Stapleton y Hollaender, 1952 en Aspergillus terreus. Markert, 1952, 1956 en Glomerella cingulata. Lindegren y Lindegren, 1941; Sansome et al., 1945; De Serres y Kolmark, 1958; Giles, 1951; en Neurospora crassa, etc. Mutaciones producidas con rayos gamma como los trabajos de Dupin, 1963 en Saccharomyces cerevisiae y Heslot, 1962 en Schizosaccharomyces pombe. Los producidos por radiación ultravioleta como los de Apirion, 1963; Kafer y Chen, 1964; Kilbey, 1964a en Aspergillus nidulans. Markert, 1952, 1953 en Glomerella

cingulata. Lindegren y Lindegren, 1941; Beadle y Tatum, 1945; Reissing, 1963a; Howe y Terry, 1962 en Neurospora crassa, etc.

Se determinó el efecto de la radiación ultravioleta sobre la capacidad de formar colonias para obtener una indicación de la susceptibilidad relativa de las esporas de M. anisopliae y sus cuatro mutantes. Las curvas de respuesta del logaritmo de la sobrevivencia en función de la dosis presentan, en todos los casos, mesetas iniciales que no sobrepasan un ciclo de inactivación; posteriormente las curvas se vuelven lineales en algunos casos y en otros adquieren una nueva tendencia dependiendo de la edad de las esporas y de una ligera alteración de la concentración de esporas en el proceso de irradiación. Las mesetas de las curvas presentadas en los primeros minutos de irradiación indican que las esporas aguantan cierta cantidad de daño antes de ser inactivadas. La inactivación de M. anisopliae silvestre por la radiación ultravioleta fue determinada por Berríos (6) usando esporas de diferentes edades. Nuestros resultados usando esporas del silvestre de 60 y 90 días de edad concuerdan con su trabajo. La curva de sobrevivencia del tipo silvestre se llevó a cabo para tener una base de comparación al determinar la resistencia de los mutantes a la irradiación ultravioleta. De los mutantes estudiados el FB-9-2 fue el más radio-resistente, a los 60 y 90 días de edad; el mutante FB-6-2 fue el más sensitivo a los 60 días de edad y a los 90 días adquiere mayor resistencia, similar al silvestre; FB-13 es más sensitivo que el tipo silvestre y se comporta casi igual a los 60 y 90 días de edad; mientras que el mutante FB-7-3 es más susceptible que el silvestre a los 90 días y a los 60 días de edad es casi similar al silvestre. Es posible que el color de las esporas influya en su respuesta

a la irradiación ya que algunos pigmentos presentan también absorción en la región ultravioleta.

La presencia de la micotoxina se manifestó en forma similar a lo expuesto por Praserphon y Tanada (43) quienes inyectaron las toxinas intrahemocélicamente en larvas de G. mellonella. Roberts (47) encontró que ciertos péptidos producidos en cultivos sumergidos de H. anisopliae son tóxicos para insectos. Estas toxinas producidas por el hongo causan parálisis tetánica cuando son inyectadas a larvas de G. mellonella.

En nuestro experimento la micotoxina ingerida demoró el inicio de la pupación, por lo tanto, el ciclo de vida de la larva se alargó comparándola con el control que tardó en iniciar la pupación 22-23 días después de eclosionadas y terminó a los 33 días; los adultos tardaron en emerger 33 días y concluyen su ciclo larval a los 38 días de eclosionadas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Grijpma (22) al comparar el ciclo de vida de larvas de H. grandella criadas en dieta artificial.

No se encontró correlación entre la patogenicidad y el efecto de las toxinas excretadas en medio líquido por que en las pruebas de patogenicidad las esporas se aplican exteriormente sobre la epidermis de la larva, mientras que en las pruebas de la acción de las toxinas, éstas se suministran oralmente mezcladas con la dieta larval.

Para medir la actividad enzimática se utilizó un método sencillo y común descrito por Meyrath (38), que consiste en relacionar el diámetro del área hidrolizada en un medio de cultivo adecuado con el diámetro del área cubierta por el micelio de la colonia. La actividad enzimática no se pudo medir por este método, al no producirse el halo hidrolizado por la baja acción de la actividad

de las enzimas en los medios de cultivo probados. Gabriel (19) encontró intensa actividad enzimática con Entomophthora en diversos medios con quitina; mientras que con M. anisopliae hubo poca actividad enzimática en los medios agar-quitina, agar-quitina con leche sin grasa y agar nutritivo.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación se han derivado las siguientes conclusiones:

1. De los mutantes estudiados el más patogénico es el FB-9-2, seguido por FB-6-2, FB-7-3, FB-13, siendo el silvestre el de menor patogenicidad.
2. El mutante FB-9-2 también demostró ser el más resistente de todos a la radiación ultravioleta. Los mutantes FB-6-2, FB-7-3 y FB-13 aunque resultaron ser más patogénicos que el silvestre, por su susceptibilidad a la radiación ultravioleta se les considera que tendrían un potencial inferior que el silvestre en un programa de control microbiológico.
3. En cuanto a las toxinas excretadas por el hongo y suministradas a las larvas se considera que las toxinas producidas por el tipo silvestre y el mutante FB-7-3 son las más efectivas, tanto por la mortalidad causada como su efecto retardante en el desarrollo de las larvas.
4. El efecto sobre la pupación observado con las toxinas excretadas por los mutantes FB-9-2, FB-6-2 y FB-13 se debe a inhibición en el desarrollo y no a mortalidad.

Recomendaciones:

Hacer un estudio probando la patogenicidad de cada mutante en las siete fases de H. grandella y probar con otras plagas susceptibles al hongo.

Hacer pruebas de campo con los mutantes más patogénicos.

Determinar la capacidad de formar colonias del silvestre y sus mutantes después de ser expuestas a la luz solar a fin de probar la persistencia del patógeno en el campo.

En las pruebas de irradiación se debe añadir la cantidad de agua evaporada en el transcurso de exposición a la irradiación para evitar alterar la concentración de la suspensión de esporas.

7. RESUMEN

Este trabajo es continuación de una serie de estudios sobre el uso de los hongos entomopatógenos en la lucha contra los insectos, específicamente sobre el desarrollo de mutantes de Metarrhizium anisopliae (Metch.) Sorokin que sean más patogénicos y más resistentes a la luz ultravioleta que el tipo silvestre.

M. anisopliae es utilizado con éxito en el Brasil en el control microbiológico de ciertos insectos de los pastos. En nuestro laboratorio hemos estado utilizando el insecto Hypsipyla grandella (Zeller), barrenador de las Meliáceas como insecto de prueba en los estudios comparativos de patogenicidad. Este insecto es la plaga principal de las Meliáceas de alto valor en América tropical; su control a base de insecticidas químicos es costoso y tiene que pensarse en atacar este insecto en forma integrada. El uso del hongo M. anisopliae en un programa de control microbiológico puede llegar a ser un factor importante en el manteniendo de esta plaga a niveles poblacionales que no causen daños de importancia económica.

En un estudio anterior se indujo usando radiación gamma mutantes de color de M. anisopliae, los cuales se denominaron M. anisopliae FB-9-2, FB-6-2, FB-7-3 y FB-13.

El propósito de este trabajo fue comparar la patogenicidad, la resistencia a la luz ultravioleta y la producción de toxinas de estos mutantes con el tipo silvestre.

En las pruebas de patogenicidad, usando el criterio de la CL_{50} para larvas de V fase de H. grandella, se determinó que el mutante FB-9-2 de color verde oscuro rojizo era el más patogénico seguido por los mutantes FB-6-2, de color verde claro, FB-7-3 de color amarillo café y FB-13 de color gris plateado, siendo el menos

patogénico el tipo silvestre

En cuanto a la resistencia a la luz ultravioleta se determinó reducción de la viabilidad producida por el aumento del tiempo de irradiación, una gran variación de la susceptibilidad dentro de cada mutante y el silvestre debido a la influencia de la edad de las esporas (60 y 90 días) y a las características genéticas de cada uno. El efecto del almacenamiento sobre la resistencia de las esporas a la radiación ultravioleta fue que el mutante FB-9-2 es el más radioresistente de todas las cepas estudiadas y conserva su resistibilidad, el mutante FB-6-2 aumenta su resistibilidad hasta igualar al silvestre, el FB-7-3 por lo contrario se vuelve más radiosensitivo y el mutante FB-13 siguió siendo el más susceptible aún después del almacenamiento.

El efecto de la actividad de las toxinas, producidas en el desarrollo del silvestre y sus mutantes en medio líquido a los 3, 6 y 9 días de incubación y suministradas oralmente a las larvas, fue inhibición en el desarrollo y prolongación del período larval, pérdida de movimiento y en algunos casos hasta muerte de la larva. Las toxinas producidas por los mutantes FB-13 y FB-9-2 causan baja mortalidad (5 a 10 por ciento), las producidas por el mutante FB-6-2 causan del 5 al 25 por ciento de mortalidad, mientras que la mortalidad causada por el tipo silvestre y el mutante FB-7-3 pueden alcanzar hasta un 90 por ciento con las mayores concentraciones.

7a. SUMMARY

This work is a continuation of a series of studies on the use of entomogenous fungi for the control of insects, specifically on the development of mutants of Metarrhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin that may be more pathogenic and resistant to ultraviolet radiation than the wild type.

M. anisopliae is used successfully in Brazil in the microbiological control of certain pests of pastures. In our laboratory we have been utilizing the shoot borer of the Meliaceae, Hypsipyla grandella (Zeller), as a test insect in comparative studies of pathogenicity. This insect is the most important pest of the high value Meliaceae in tropical America. Its control, based on chemical insecticides, is expensive and this insect must be attacked in an integrated manner. The use of the fungus M. anisopliae in a microbiological control program may be an important factor in the maintenance of this pest at population levels that do not cause important economic damage.

In a previous study mutants of M. anisopliae were induced by gamma radiation, these being denominated M. anisopliae FB-9-2, FB-6-2, FB-7-3, and FB-13.

The objective of the present work was to compare the pathogenicity, resistance to UV radiation, and the production of toxins of these mutants with the wild type of M. anisopliae.

In the pathogenicity tests, using the criterion of CL_{50} for fifth instar larvae of H. grandella, it was determined that the mutant FB-9-2 (a reddish dark-green color) was the most pathogenic, followed by the mutants FB-6-2 (light green), FB-7-3 (yellow-brown),

and FB-13 (silver-gray color), the wild type (dark green) being the least pathogenic.

In UV radiation tests, viability was reduced with increased exposure time. UV-resistivity varied widely within each mutant and the wild type due to the influence of spore-age (60-90 days) and genetic characteristics. Storage of the spores had various effects on resistance to UV radiation. The mutant FB-9-2 conserved its resistance and was most resistant to UV. Resistance of FB-6-2 was increased to that of the wild type while FB-7-3 lost some UV-resistance. FB-13 remained the most susceptible even after storage.

When supplied orally to H. grandella larvae, toxins produced by the growth of the wild type and its mutants in liquid media after 3, 6 and 9 days, inhibited development and prolonged the larval period, brought about loss of movement and, in some cases, even death of the larvae. The toxins produced by the mutants FB-13 and FB-9-2 caused low mortality (5 to 10 percent), those produced by FB-6-2 caused 5 to 25 percent mortality, while the wild type and FB-7-3 produced up to 90 percent mortality at higher concentrations.

8. LITERATURA CITADA

1. ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267. 1925.
2. AINSWORTH, G. C., JAMES, P. W. y HAWKSWORTH, D. L. *Dictionary of the fungi*. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971. 663 p.
3. ALLAN, G. G., GARA, R. I. y WILKINS, R. M. Studies on the shootborer, Hypsipyla grandella Zeller. III. The evaluation of some systemic insecticides for the control of larvae in Cedrela odorata L. *Turrialba (Costa Rica)* 20(4): 478-487. 1970.
4. BERRIOS, F. e HIDALGO-SALVATIERRA, O. Estudios sobre el barrenador Hypsipyla grandella Zeller. VIII. Susceptibilidad de la larva a los hongos Beauveria bassiana (Bal.) y Beauveria tenella (Del.). *Turrialba (Costa Rica)* 21(4):451-454. 1971.
5. _____ e HIDALGO-SALVATIERRA, O. Estudios sobre el barrenador Hypsipyla grandella Zeller. VI. Susceptibilidad de la larva al hongo Metarrhizium anisopliae (Metch.). *Turrialba (Costa Rica)* 21(2):214-219. 1971.
6. _____. Estudio de la susceptibilidad del barrenador de las Meliáceas Hypsipyla grandella Zeller al hongo Metarrhizium anisopliae. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1972. 80 p. (mimeo)
7. BOLETIN INFORMATIVO del Grupo de Trabajo sobre Hypsipyla. Turrialba, IICA, 1970. 4 p.
8. BROOKS, D. L. y RAUN, E. S. Entomogenous fungi from corn insects in Iowa. *Journal of Invertebrate Pathology* 7(1):74-81. 1965.
9. CADAHIA, D. Las radiaciones ionizantes en la entomología aplicada. *Boletín del Servicio de Plagas Forestales (España)* 15:15-27. 1965.
10. CARLSON, J. G. Effects of radiation on mitosis. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 35:89-101. 1950.
11. CLERK, G. C. y MADELIN, M. F. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 48(2):193-209. 1965.
12. COOKE, A. R. Effect of gamma irradiation on the ascorbic acid content of green plants. *Science* 117 (3028):588-589. 1953.

13. CHAOU, T. W. et al. Effects of gamma radiation on Penicillium expansum L. I. Some factors influencing the sensitivity of the fungus. *Radiation Botany* 10(6):511-516. 1970.
14. DOUROJEANNY, R. M. El barrenador de los brotes (Hypsipyla grandella) en cedro y caoba. *Agronomía (Perú)* 30(1):35-43. 1963.
15. ENTWISTLE, P. F. The current situation on shoot, fruit, and collar borers of the meliaceae. Oxford, England, University of Oxford, 1968. 15 p.
16. ESSER, K. y KUENEN, R. Genetics of fungi. Translated by Erich Steiner. New York, Springer-Verlag, 1967. 499 p.
17. FOOD AND AGROCULTURAL ORGANIZATION. Shootborers of the Meliaceae. *Unasylyva* 12(1):30-31. 1958.
18. GABRIEL, B. P. Fungus infection of insects via the alimentary tract. *Journal of Insect Pathology* 1(1):319-330. 1959.
19. _____. Enzymatics of some entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 11(1):70-81. 1968.
20. GETZIN, L. W. Spicaria rileyi (Farlow) an entomogenous fungus of Trichoplusia ni (Hübner). *Journal of Insect Pathology* 3(1):2-10. 1961.
21. _____ y SHANKS, C. H. Infection of the garden symphytan Scutigera immaculata (Newport) by Entomophthora coronata (Cans.) Kev. and M. anisopliae (Met.) Sor. *Journal of Insect Pathology* 6(3):542-543. 1964.
22. GRIJPMAN, P. Studies on the shootborer Hypsipyla grandella (Zeller). V. Observations on a rearing technique and a host selection behavior of adults in captivity. *Turrialba (Costa Rica)* 21(2):202-213. 1971.
23. GUNTARDT, H. M. Studies on aged seeds. II. Relation of age seeds to cytogenetic effects. *Agronomy Journal* 45(9):438-441. 1953.
24. HALL, I. M. Some fundamental aspects of applied insect pathology. In Metcalf, R. L. ed. *Advances in pest control research*. New York, Interscience, 1961. v. 4, pp. 1-32.
25. _____. El uso de microorganismos en el control biológico. En Bach, P., ed. *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. Traducción por C. M. Castaños. México, D. F., Continental, 1968. pp. 715-737.
26. HEINRICH, C. American moths of the subfamily Phycitinae. Washington, D. C., Smithsonian Institution, 1956. 581 p.

27. HIDALGO-SALVATIERRA, O. y PALM, J. D. Estudios sobre el barrenador de los brotes Hypsipyla grandella (Zeller) (Lep., Pyralidae). XIV. Susceptibilidad de la larva del primer estadio al Bacillus thuringiensis. Turrialba (Costa Rica) 22(4):467. 1972.
28. HOLDRIDGE, L. R. Comments on the silviculture of Cedrela. Caribbean Forester 4(2):77-80. 1954.
29. HOLLAENDER, A. et al. Quantitative irradiation experiments with Neurospora crassa. II. Ultraviolet irradiation. American Journal of Botany 32(4):226-235. 1945.
30. JAQUES, R. P., STULTZ, H. T. y JUSTON, F. The mortality of the pale leaf roller and winter moth by fungi and nematodes applied to soil. Canadian Entomologist 100(8):813-818. 1968.
31. JIMENEZ, F. Estudio comparativo de patogenicidad de diferentes variedades del Bacillus thuringiensis en larvas del instar de Hypsipyla grandella (Zeller). Tesis Ing. Agr. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, 1973. 58 p. (mimeo).
32. KANDASAMY, D. Hypsipyla robusta (Moore) a new host for Beauveria tenella (Delacroix) Siermaszko. Journal of Invertebrate Pathology 13(1):149-150. 1969.
33. KILGORE, W. W. Pest control: biological, physical and selected chemical methods. New York, Academic Press, 1967. 474 p.
34. McCAULEY, V.J.E., ZACHARUCK, R. Y. y TINLINE, R. D. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). Journal of Invertebrate Pathology 12(3):444-459. 1968.
35. MADELIN, M. F. Los hongos endoparásitos de insectos. Endeavour 19(75):181-190. 1960.
36. MALLA, D. S. et al. In vitro susceptibility of strains of Penicillium viridicatum and Aspergillus flavus to beta irradiation. Experientia 23:492-495. 1967.
37. MARCHINATTO, J. Los hongos parásitos de las plantas. Buenos Aires, Acme, 1951. pp. 51-56.
38. MEYRATH, J. et al. Induction of amylase-producing mutants in Aspergillus oryzae by different irradiations. In Symposium on use for Radiation and Radioisotopes for Genetic Improvement of Industrial Microorganisms. Vienna 1971. Radiation and radioisotopes for industrial microorganisms. Proceedings, Vienna, International Atomic Energy Agency, 1971. pp. 137-155.

39. NIYAJINA, S. y KAWASE, S. Changes in virus infectivity titer in the hemolymph and midgut during the course of a cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm. *Journal of Invertebrate Pathology* 12:329-334. 1968.
40. MOH, C. C. Efecto de radiaciones ionizantes en las plantas superiores. IICA. Boletín Técnico No. 3. 1958. 22 p.
41. MORRIS, O. N. Quantitative infectivity studies on the nuclear polyhedrosis of the Western oak looper Lambdina fiscellaria sommaria (Hulst.). *Journal of Insect Pathology* 4:207-215. 1962.
42. NIRULA, K. K. Observations on the green muscardine fungus in populations of Oryctes rhinocerus L. *Journal of Economic Entomology* 50(6):767-769.
43. PRASERPHON, S. y TANADA, Y. Mycotoxins of Entomophthoraceous fungi. *Hilgardia* 39(21):581-599. 1969.
44. RAMIREZ, J. Investigación preliminar sobre biología, ecología y control de Hypsipyla grandella Zeller. Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) no. 16:54-77. 1964.
45. _____. Apuntes sobre el control de Hypsipyla grandella Zeller. Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) no. 22:33-37. 1966.
46. RAO, V. P. y BENNETT, F. D. Possibilities of biological control of the Meliaceae shootborers Hypsipyla spp. (Lepidoptera:Phycitinae). Commonwealth Institute of Biological Control. Technical Bulletin no. 12. 1969. pp. 61-81.
47. ROBERTS, D. W. Toxins from the entomogenous fungus Metarrhizium anisopliae. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of Invertebrate Pathology* 8(2):212-221. 1966.
48. _____. Toxins from the entomogenous fungus Metarrhizium anisopliae. II. Symptoms and detection in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology* 8(2):222-227. 1966.
49. _____. Toxins from the entomogenous fungus Metarrhizium anisopliae: Isolation of dextruxins from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology* 14(1):82-88. 1969.
50. ROOVER, M. Observaciones sobre el ciclo de vida de Hypsipyla grandella (Zeller) en Barinitas, Venezuela, Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) no. 38:1-36. 1971.

51. ROSS, H. Introducción a la entomología general o aplicada. Traducido por Miguel Fusté. 2 ed. Barcelona, España, Omega, 1968. 536 p.
52. SANSONE, E. R., DEMEREC, H. y HOLLAENDER, A. Quantitative irradiation experiments with Neurospora crassa. I. Experiments with X-rays. American Journal of Botany 32(4): 218-225. 1945.
53. SHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycose caused by the fungi Beauveria and Metarrhizium. Journal of Insect Pathology 6(1):8-10. 1964.
54. SMITH, K. C. y HANAWALT, P. C. Molecular photobiology. New York, Academic Press, 1969. 230 p.
55. SMITH, L. A rare dominant chlorophyll mutant in durum wheat induced by atomic bomb radiatinn. Journal of Heredity 43 (3):125-128. 1952.
56. SPARROW, A. A survey of the radiosensitivity of some higher plants. Abstract Radiation Research 3:349. 1955.
57. STAKMAN, E. C. y HARRAR, J. G. Principios de patología vegetal. Traducido por Juan C. Lindquist. Argentina, Euseba, 1968. pp. 72-73, 76-79. 265-268.
58. STEINHAIS, E. A. Principles of insect pathology. New York, McGraw-Hill, 1949. pp. 318-398.
59. STERRINGA, J. T. Studies on the shootborer Hypsipyla grandella (Zeller) (Lep:Pyralidar) XXII. An improved method for artificial rearing. Symposium sobre control integral de Hypsipyla. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1973. (mimeo)
60. SWEETMAN, H. L. The principles of biological control. Iowa, Brown, 1963. pp. 42-54.
61. TILLMANS, H. S. Apuntes bibliográficos sobre Hypsipyla grandella Zeller. Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) no. 14: 83-94. 1964.
62. TOUMANOFF, K. The action of various entomopathogenous fungi of Reticulatermes santimonensis. Biological Abstracts 49(7):37728. 1968.
63. VEEN, K. H. Oral infection of second-instar nymphs of Schistocerca gregaria by Metarrhizium anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology 8(2):254-256.

64. VEGA, L. Influencia de la silvicultura en el comportamiento de Cedrela en Surinam. In Symposium on integrated control of Hypsipyla. Turrialba, Costa Rica, 1973. Proceedings. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1973. p. irr.
65. WALSTAD, J. D., ANDERSON, R. F. y STAMBAUCH, W. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (Beauveria bassiana and Metarrhizium anisopliae). Journal of Invertebrate Pathology 16(2):221-226. 1970.
66. WILKINS, R. M. Suppression of the shootborer, Hypsipyla grandella Zeller (Lepidoptera:Phycitinae), with controlled release insecticides. Tesis Dr. Scientiae. Seattle, Washington, University, 1972. 103 p. (mimeo)
67. YASEEN, M. y BENNETT, F. D. Investigations into the biological control of Hypsipyla grandella Zeller in Trinidad, W. I. s.n.t. 4 p. (mecanografiado)
68. ZACHARUCK, R. Y. y TINLINE, R. D. Pathogenicity of M. anisopliae and other fungi for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. Journal of Invertebrate Pathology 12(3): 294-309. 1968.
69. _____, Fine structure of the fungus M. anisopliae infecting tree species on larval elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. Journal of Invertebrate Pathology 15(3):372-396. 1970.

A P E N D I C E

Cuadro 1. Dieta no. 12 utilizada para alimentación de larvas de H. grandella en las pruebas de patogenicidad y micotoxinas de Metarrhizium anisopliae y sus mutantes

Ingredientes	Cantidad
Polvo de zanahoria	50 g
Acemite	75 g
Harina de soya	35 g (350 ml de agua)
Azucar	60 g
Agar	10 g (300 ml de agua)
Alfacel	15 g
Sal Wesson's	5 g
Mezcla de vitaminas	10 g
Methyl-p-hydroxibenzoico	1 g
Acido sórbico	1 g
Acido ascórbico	0,5 g
Benzoato de sodio	1 g
Acido acético 25%	10 ml
KOH 4N	5 ml
Formaldehido 10%	5 ml
Aureomicina	5,5 ml
Total	650 ml de agua

Mezcla de vitaminas de la Nutritional Biochemical Corp., vendida bajo el nombre de Vitamin Diet Fortification Mixture.