

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL BARRENADOR DE LAS MELIACEAS

Hypsipyla grandella Zeller AL HONGO Metarrhizium anisopliae

(Metchnikoff) Sorokin

Tesis de Grado de Magister Scientiae

Francisco Berríos Escorcía



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación
Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales
Turrialba, Costa Rica
Marzo, 1972

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL BARRENADOR DE LAS MELIACEAS

Hypsipyla grandella Zeller AL HONGO *Metarrhizium*

anisopliae (Metchnikoff) Sorokin

Tesis

presentada al Consejo de la Escuela para Graduados

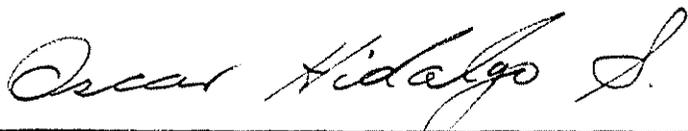
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

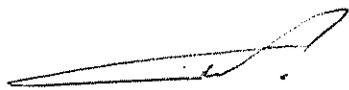
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:



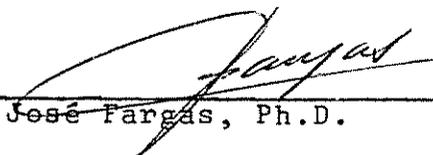
Oscar Hidalgo-Salvañierra, Ph.D.

Consejero



Gilberto Páez, Ph.D.

Comité



José Fargás, Ph.D.

Comité



Kamta P. Katiyar, Ph.D.

Comité

Marzo 1972

A Auxiliadora y Francisco Benito,
con cariño

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su especial reconocimiento

- Al Dr. Oscar Hidalgo-Salvatierra, la colaboración prestada durante el curso de esta investigación.
- A los Drs. Gilberto Páez, José Fargas y Kamta Katiyar, miembros del comité consejero, por su buena voluntad y cooperación.
- Al Ing. Pieter Grijpma y al Gobierno de Holanda por la colaboración y suministro de parte de los materiales utilizados en este estudio.

BIOGRAFIA

El autor nació en León, Nicaragua, en el año 1944.

Llevó a cabo sus estudios Universitarios en la Escuela Nacional de Agricultura y Ganadería de Nicaragua, habiendo obtenido el título de Ingeniero Agrónomo en 1968.

A partir de esa fecha trabajó para los Ministerios de Agricultura y Educación de su país.

En Octubre de 1970 ingresó al Departamento de Cultivos y Suelos del Centro Tropical de Enseñanza e Investigación, habiendo obtenido el grado de *Magister Scientiae* en Marzo de 1972.

CONTENIDO

página

1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISION DE LITERATURA	
2.1	Hongos Entomopat6genos.	3
2.1.1	Características generales	3
2.1.2	Características de <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.) Sorokin.	4
2.1.2.1	Sintomatología.	6
2.1.2.2	Patogenicidad	7
2.2	El Barrenador de las Meliáceas.	10
2.2.1	Importancia	10
2.2.2	Taxonomía y biología.	11
2.2.3	Medidas de control.	12
2.2.3.1	Prácticas culturales.	12
2.2.3.2	Control químico	13
2.2.3.3	Control biológico	13
2.2.3.4	Aplicación de las radiaciones en el combate de insectos	16
3.	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Localización del Estudio.	19
3.2	Cultivo del Hongo	19
3.3	Cría del insecto.	20
3.3.1	Determinación del número de fases de <i>H. grandella</i>	21
3.4	Métodos Generales de Inoculación.	27
3.4.1	Prueba preliminar de patogenicidad del hongo <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. grandella</i>	23
3.4.2	Prueba de patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> sobre las diferentes fases de <i>H. grandella</i>	23
3.4.3	Determinación de dosis letal-50	25
3.5	Métodos de Irradiación.	26
3.5.1	Irradiación ultravioleta.	26
3.5.2	Irradiación gamma	27
4.	RESULTADOS	
4.1	Prueba Preliminar de Patogenicidad del Hongo <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. grandella</i>	28
4.2	Determinación del Número de Fases de <i>H. grandella</i>	32
4.3	Prueba de Patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> Sobre Diferentes Fases de <i>H. grandella</i>	43

	página
4.4 Determinación de Dosis Letal 25, 50 y 75. . . .	46
4.5 Sobrevivencia de Esporas de <i>M. anisopliae</i> a la Radiación Ultravioleta	50
4.6 Sobrevivencia de Esporas de <i>M. anisopliae</i> alla Irrradiación Gamma.	53
4.7 Obtención de Mutantes de <i>Metarrhizium anisopliae</i> Mediante el Uso de Rayos Gamma.	55
5. DISCUSION	57
6. CONCLUSIONES	63
7. RESUMEN	65
7a. SUMMARY	68
8. LITERATURA CITADA	71
APENDICE	76

LISTA DE CUADROS

Cuadro no.		página
1	Dietas utilizadas para la alimentación de larvas de <i>Hypsipyga grandella</i> Zeller en las diferentes pruebas de patogenicidad	21
2	Mortalidad de larvas de <i>Hypsipyga grandella</i> Zeller atacadas por el hongo <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.) a una concentración de $1,2 \times 10^7$ esporas viables/ml	32
3	Valores promedios y desviación estandar del tiempo transcurrido entre ecdisis sucesivas hasta pupación de larvas de <i>H. grandella</i>	33
4	Valores promedios y desviación estandar del largo (en mm) de cuerpo de larvas de <i>H. grandella</i> al tiempo de ecdisis	35
5	Valores promedios y desviación estandar del ancho (en mm) de cápsulas cefálicas de <i>H. grandella</i> al tiempo de ecdisis	41
6	Valores promedios y desviación estandar del largo (en mm) de cápsulas cefálicas de <i>H. grandella</i> al tiempo de ecdisis	41
7	Mortalidad de larvas de <i>H. grandella</i> en V fase a los 15 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de <i>M. anisopliae</i>	48
8	Número de esporas viables/ml de <i>M. anisopliae</i> requeridas para producir 25, 50 y 75 por ciento de mortalidad en la V fase de <i>H. grandella</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura no.		página
1	Larvas de <i>Hypsipyla grandella</i> Zeller atacadas por el hongo <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.) muscardina verde	29
2	Distribución de la mortalidad de larvas de <i>H. grandella</i> Zeller atacadas por el hongo <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.) a una concentración de $1,2 \times 10^7$ esporas viables/ml	30
3	Porcentaje de mortalidad total acumulada de larvas de <i>H. grandella</i> Zeller expuestas a esporas de <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.)	31
4	Distribución del tiempo transcurrido entre ecdisis sucesivas hasta pupación de larvas de <i>H. grandella</i>	34
5	Distribución del largo del cuerpo de larvas de <i>H. grandella</i> Zeller al tiempo de ecdisis	36
6	Curva promedio de crecimiento de larvas de <i>H. grandella</i> y banda de confianza de 96,4%	38
7	Distribución del ancho de cápsulas cefálicas de <i>H. grandella</i> al tiempo de ecdisis	39
8	Relación del ancho promedio de cápsulas cefálicas y el tiempo promedio de ecdisis	40
9	Distribución del largo de cápsulas cefálicas de <i>H. grandella</i> al tiempo de ecdisis	42
10	Relación entre el largo promedio de las capsulas cefálicas y el tiempo promedio de ecdisis	44
11	Distribución de la mortalidad causada por el hongo <i>M. anisopliae</i> sobre las diferentes fases de <i>H. grandella</i>	46
12	Diferentes fases de <i>H. grandella</i> Zeller atacadas por el hongo <i>Metarrhizium anisopliae</i> (Metch.) a una concentración de $8,3 \times 10^7$ esporas viables/ml	47

Figura no.		página
13	Línea de regresión calculada para los valores de dosis-mortalidad de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. grandella</i>	49
14	Sobrevivencia relativa de esporas de <i>M. anisopliae</i> en suspensión acuosa, después de irradiadas con luz ultravioleta 254 nm ($I_0 = 17,5$ ergios/mm ² /seg)	51
15	Sobrevivencia relativa de esporas de <i>M. anisopliae</i> en suspensión acuosa, después de irradiadas con rayos gamma ($I_0 = 1,4$ kr/min)	54

1. INTRODUCCION

El barrenador de las Meliáceas (*Hypsipyra* sp.), constituye la plaga más perjudicial que limita el establecimiento y desarrollo de plantaciones de cedros (*Cedrela* spp.), caobas (*Swietenia* spp.), Khayas, Carapas y otras especies no Meliáceas.

El barrenador ataca principalmente los brotes terminales de los árboles y es el responsable de fracasos de plantaciones en Puerto Rico, Perú, Trinidad, Burma y Java (9, 19, 46, 61).

El control de esta plaga se hace en extremo difícil debido a su hábito de alimentación y a la falta de conocimiento sobre la biología del insecto.

A pesar de la gravedad del problema, las investigaciones sobre la ecología del insecto, dinámica de poblaciones, taxonomía, hospederos y cría se encuentran en estado incipiente. Sin embargo, en algunos países existen programas de investigación sobre problemas específicos relacionados con el insecto. En Bangalore, India, se realizan estudios sobre el control biológico de esta plaga; en Barinitas, Venezuela, se han realizado algunos trabajos sobre ciclo de vida y control químico del insecto; finalmente, en Turrialba, Costa Rica, se llevan a cabo trabajos sobre manejo del microambiente como un control parcial del insecto, control biológico, selección de hospederos y comportamiento, introducción de Meliáceas resistentes y dietas para la cría en el laboratorio del insecto (6, 45, 61).

De las consideraciones expuestas se deduce que el control en forma integrada, combinando prácticas silviculturales con

métodos químicos y biológicos, es la forma más recomendada para combatir esta plaga.

El objetivo general de esta investigación es determinar la posibilidad de usar el hongo *Metarrhizium anisopliae* como insecticida biológico para el control de *Hypsipyla grandella* Zeller. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Determinar la fase de *Hypsipyla grandella* más sensitiva a *M. anisopliae*.
- b) Estimar la dosis letal media (DL₅₀) de *M. anisopliae* sobre *H. grandella*.
- c) Determinar la sobrevivencia de las esporas de *M. anisopliae* a las radiaciones gamma y ultravioleta.
- d) Observar el cambio en la patogenicidad de mutantes del hongo.

2. REVISION DE LITERATURA

En 1835, Bassi de Lodi demostró que infecciones naturales ocurridas en el gusano de seda, *Bombix mori* (Linn) eran causadas por el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, el cual se multiplicaba dentro y sobre el cuerpo del gusano (55). Entre los microorganismos que han sido usados en trabajos de control microbiológico se encuentran bacterias, hongos, virus y protozoos (56).

En el campo de la micología aplicada a insectos cabe mencionar que la mayoría de los hongos parásitos de insectos son del tipo facultativo ya que su vida no depende enteramente del substrato donde viven; el hecho mismo de matar al huesped sugiere que su parasitismo no sea obligado. La adquisición del hábito entomopatógeno implica la adopción de características como, el asegurarse el contacto con el insecto y la capacidad de penetrar en él, invadirlo y matarlo. El cambio de hábito en un sentido u otro puede deberse a la adquisición de una determinada característica fisiológica adecuada debido a una alteración genética en el hongo (39).

2.1 Hongos Entomopatógenos

2.1.1 Características generales

Dentro del reino vegetal, los hongos constituyen una agrupación natural, perteneciente a la división Micota, sub-división Eumicota (2).

Los hongos causantes de infecciones y enfermedades en insectos están incluidos en cada una de las cuatro clases: Ficomycetos, Ascomycetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos. Entre los

géneros de Ficomicetos que atacan insectos, se encuentran, Entomophora, Massospora, Empusa y Coelomyces. Estos se caracterizan por sus hifas multinucleadas y no septadas excepto donde se delimitan los órganos reproductivos. Los órganos sexuales están usualmente presentes y producen oosporas o cigosporas.

Los géneros de Ascomicetos que comunmente se encuentran atacando insectos son Cordyceps, Hypocrella, Hirsutella, Sporotrichum y otros. Su característica sobresaliente es la formación de un saco unicelular, asca que contiene un número definido de esporas endógenas, ascosporas.

Los Basidiomicetos presentan una clase especial de esporóforo, el basidio, el cual produce basidiosporas en el extremo de finas protuberancias llamadas esterigmatas. El grupo entomógeno de los Basidiomicetos presenta poca importancia.

Los hongos imperfectos o Deuteromicetos constituyen una subdivisión heterogénea de los verdaderos hongos. El desconocimiento del estado perfecto de algunas especies, ha decidido su inclusión en este grupo. Muchos géneros de Deuteromicetos se encuentran atacando insectos, ejemplo: Acrostalagnus, Aspergillus, Beauveria, Cladosporinum, Fusarium, Metarrhizium, Microcera, Penicillium, Sorosporella, Spicaria y otros (56).

2.1.2 Características de *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin

El género *Metarrhizium*, comprende las especies: *album*, *anisopliae*, *brunnem* y *glutinosum* (54). *Metarrhizium anisopliae* se caracteriza por sus esporas de 5 a 7,5 μ de largo y de 2,3 a 3,7 μ

de ancho (38). Rhada *et al.* (44) indican que existe considerable variación en la dimensión de las esporas, diferenciando dos categorías: largas, con esporas cuyas dimensiones varían entre 10,6 a 12,0 μ y cortas con dimensiones entre 3,5 a 8,2 μ . El color verde de sus esporas y la apariencia característica de las larvas muertas por un ataque de *M. anisopliae* le ha valido el nombre de 'muscardina verde'. El color verde no es característico de todas las especies del género *Metarrhizium* - *M. album* Petch, patógeno de salta hojas en Ceilán, es de color blanco; *M. brunnem*, patógeno de cicadelidos en las Islas Filipinas, es amarillo café; *M. glutinosum* Pope presenta conidias desde verde oliváceas hasta negro oliváceas (54).

Crece fácilmente en medios artificiales. En condiciones de laboratorio, temperaturas entre 24 y 26°C son óptimas para su crecimiento, siendo el ámbito de desarrollo normal entre 10 y 30°C (44, 51, 54). Walstad *et al.* (60) realizaron experimentos para estudiar el efecto de factores ambientales sobre *M. anisopliae*, habiendo encontrado que la germinación se llevaba a cabo a temperaturas entre 10 y 35°C, ocurriendo la más rápida germinación entre 25 y 30°C. El tiempo requerido para germinar a temperaturas entre 25 y 30°C fue de cuatro días.

La temperatura juega un papel importante en la sobrevivencia de esporas almacenadas. Walstad y asociados (60) lograron determinar que a 8°C las esporas permanecen viables por lo menos 12 meses, sin embargo, a 21°C las esporas sobreviven por un período de 2,5 meses.

Experimentos similares al anterior fueron conducidos por Clark y Madelin (12) llegando a la conclusión de que la longevidad de las conidias de *M. anisopliae*, al igual que la de otros hongos, *Beauveria bassiana* y *Phaeoillomyces farinosus*, decrece a medida que la temperatura de almacenamiento incrementa de 8 a 25°C. La longevidad también fue reducida por la acción de la luz visible. Máxima sobrevivencia fue obtenida a 8°C, en oscuridad y a 75% de humedad relativa y todavía con una esporulación de 75% a los 455 días.

La germinación y formación de conidias requieren condiciones de humedad superiores a 70% (44). Walstad *et al.* (60) señalan que cantidades menores de 90% HR previenen la germinación; siendo las condiciones de humedad también críticas para la esporulación del hongo, pero esta ya no ocurre por debajo de 92,5% HR.

2.1.2.1 Sintomatología

La infección del hospedero por el hongo se lleva a cabo a través de la pared del tubo digestivo o bien a través del tegumento (39, 54), ocurriendo a menudo por ambas vías (39). Estudios histopatológicos de la acción de la muscardina verde en larvas de elatéridos (Coleoptera) revelan que la penetración ocurre directamente a través de la cutícula membranosa o esclerotizada, viéndose facilitada dicha penetración por mecanismos enzimáticos y presión mecánica (37, 62). Ocasionalmente el hongo penetra en el huesped, a través de espiráculos.

La sintomatología de la micosis en insectos se caracteriza por a) cambios de conducta: pérdida de apetito, apatía, movimientos débiles y desacompañados debido a parálisis parciales, finalmente la larva pierde el reflejo de enderezamiento permaneciendo encorvada; b) decoloración: los cambios de color que ocurren en insectos atacados pueden deberse al color mismo del hongo, o a pigmentos que éste produce; c) cambios de estructura externa e interna: al penetrar el hongo en el hospedador perfora las membranas intersegmentarias del abdomen, las hifas invaden además del tejido adiposo, los sistemas musculares y nerviosos, la presencia del propio hongo llenando el cuerpo del hospedador da la característica rigidez post-mortal de la larva; d) alteraciones fisiológicas del insecto: aumento exagerado del consumo de oxígeno, pérdida de peso, histólisis producto de actividad enzimática; estos síntomas se pueden presentar a un mismo tiempo o de modos sucesivos (39, 54). En cuatro a siete días se presenta la mayor mortalidad (24, 54).

La muscardina verde, *M. anisopliae* ataca muchos insectos y probablemente fue el primer hongo usado en el control de plagas con hongos (56).

2.1.2.2 Patogenicidad

La patogenicidad de *M. anisopliae* ha sido probada en varios experimentos (5, 7, 23, 24, 33, 49, 54, 58, 63). En 1886 y 1888 Krassilstchik usó *M. anisopliae* en el control del curculiónido de la remolacha azucarera, *Cleonus punctiventris*, indicando alta mortalidad, entre 50 a 80% (54).

Rorer (49), en un experimento de campo encontró que concentraciones de 2 a 3 lb de esporas/acre inducen un promedio de mortalidad cerca de 184.000 insectos/acre: el experimento se realizó con el cercópido *Tomaspis varia* en caña de azúcar.

Brooks y Raum (7) informaron que de nueve géneros de hongos aislados de más de 200 insectos representantes de ocho especies de plagas del maíz, *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* eran los más patógenos; el taladrador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) fue utilizado como animal de prueba para determinar la patogenicidad de los organismos fungosos.

Zacharuk y Tinline (63) determinaron que todos los estadios de la mayoría de especies económicas de elatéridos en la localidad de Saskatchewan, eran susceptibles a infecciones causadas por el hongo *M. anisopliae*; la resistencia fue mayor en huevos y larvas que en adultos, así mismo diferencias en susceptibilidad entre especies y tamaños de larvas fue notorio.

Getzin y Shanks (24) trabajando con sinfílidos, señalan que *M. anisopliae* fue menos patogénico que *Entomophthora coronata*. La mortalidad de sinfílidos bajo la acción de *M. anisopliae* fue entre 60 y 90% en condiciones de alta humedad, dándose el máximo de mortalidad entre cuatro y seis días después del tratamiento a 25°C. Al cabo de 48 horas de muerto, el cadáver de los artrópodos fue cubierto con una masa de micelio blanco, que produjeron esporas verdes después de uno a dos días.

Larvis (36) encontró *M. anisopliae* atacando la tercera fase de *Phyllophaga auxia*.

Shaerffenberg (51) utilizando la cuarta fase del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* encontró que las larvas sucumbían al ataque de *M. anisopliae* en 7 a 10 días a temperaturas entre 22 y 26°C y en 10 a 14 días entre 18 y 20°C.

Jaques *et al.* (33) determinaron que *M. anisopliae* a concentraciones de $1,8 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^8$ esporas/cc redujo la sobrevivencia de larvas de *Pseudoxentera mali* (Freeman) y *Operophtera brumata* (Linnaeus) en una proporción mayor que el hongo *Beauveria bassiana* y el nemátodo DD-136. Bell y Hamalle (5) en experimentos realizados con *M. anisopliae* infectando al curculiónido del frijol de vaca, *Chalcodermus aeneus*, encontraron una infectividad de 100% después de seis días de tratados. Experimentos de campo posteriores indicaron una infectividad de 88%.

En general la susceptibilidad de insectos a la acción de patógenos parece incrementar a medida que los insectos avanzan en edad, este ha sido el caso especialmente con bacterias, virus, protozoos y hongos (35).

Fox (22) encontró que *M. anisopliae* producía mortalidad alta en larvas del escarabajo *Agriotes obscurus* (Linn) antes, durante y después del periodo pupal. Muchas de las larvas muertas habían sido infestadas y murieron durante el estado prepupal.

Bünzly y Büttiker (8) encontraron que *M. anisopliae* se desarrolló en pocos especímenes del lamelicornio *Anómala existialis* y su ocurrencia como patógeno principal era esporádica y estaba confinada a la 3era. fase del insecto.

Algunos resultados son contradictorios a la regla general de que a mayor edad, mayor susceptibilidad. Getzin (23) al comparar patogenicidad entre *Spicaria rileyi*, *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium brunneum* y dos cepas de *M. anisopliae*, encontró que la mayoría de las larvas de *Trichoplusia ni* atacadas por *M. anisopliae* estaban en la 1era. fase y las atacadas por *Spicaria rileyi* se encontraban en la 3era. fase.

2.2 El Barrenador de las Meliáceas

2.2.1 Importancia

El barrenador de las Meliáceas *Hypsipyla* spp. (Lepidoptera:Phycitidae) es una plaga seria en plantaciones de cedro (*Cedrela* spp.) y caoba (*Swietenia* spp.) en los bosques tropicales y subtropicales de las regiones de Indo-Malaya, Australia, Africa, Indias Occidentales, Centro y Sur América (45, 57, 61). *Hypsipyla grandella* (Zeller) en el nuevo mundo e *Hypsipyla robusta* (Moore) en el viejo mundo constituyen los miembros más importantes del género *Hypsipyla* (61).

El daño causado por el ataque de *Hypsipyla* consiste en la muerte de meristemas terminales y axiales, construcción de galerías en los tallos y considerable retardo del crecimiento; a consecuencia del ataque los individuos afectados son deformados al extremo que su valor comercial es prácticamente nulo (15, 18, 45). Económicamente el ataque de *Hypsipyla* es casi siempre desastroso. Durante el período de 1935 a 1943 en Puerto Rico, 1.000.000 de Cedrelas y 835.000 Swietenias fueron atacadas por *Hypsipyla*.

Situación similar se presentó en el Perú, 60% de Cedrelas y 10% de Swietenias eran perdidas por el ataque del barrenador (9, 19).

2.2.2 Taxonomía y Biología

El conocimiento de la taxonomía y biología de *Hypsipyra* spp. es fundamental para el desarrollo de métodos de control. Estos estudios deben realizarse en forma intensiva y sobre una base regional para poder establecer diferencias locales (18).

El ficitineo *H. grandella* fue descrito en 1848 como *Nephote-ryx grandella* (18, 61). Los miembros de la familia Phycitidae com- parten ciertas características comunes en algunas de sus fases: el adulto o mariposa, presenta palpos labiales bien desarrollados; palpos maxilares presentes y en varios grados de desarrollo, raramente vestigial; lengua bien desarrollada o reducida, raramente vestigial; alas anteriores enteras, no divididas, con 11 venas o menos, la vena siete ausente y la ocho y nueve separadas o unidas; alas posteriores con ocho venas o menos, la vena ocho próxima, contigua, anastomosada, o completamente fusionada a la siete.

El género *Hypsipyra* se caracteriza por la venación de las alas anteriores. La vena sexta está encorvada y un poco separada de la base de la 8-9. Se conocen varias especies, *H. grandella*, *H. ferrealis*, *H. robusta*, *H. dorsimaculata*, *H. fluviatella* (30).

Hypsipyra grandella ha sido ampliamente descrita por Spitz y Ragnot (45).

Ramírez (45) encontró que en Venezuela durante los meses de octubre y noviembre, la duración del ciclo de vida de *H. grandella* es de 4 a 6 semanas. Dourojeanni (15) informó que en el Perú

bajo condiciones de verano el ciclo dura cerca de 46 días, retardándose en invierno en más de 60 días. Estas observaciones en conjunto con las de Entwistle (18) indican que el ciclo de vida depende de las condiciones climáticas.

El modo de ataque de *H. grandella* también depende de las condiciones climáticas. En regiones con períodos secos y lluviosos definidos, el ataque a flores y frutos es común al empezar el período lluvioso. En forestas de alta humedad hay una continua sucesión de generaciones sobre los tallos solamente.

Grijpma (27), comparando el ciclo de vida de larvas de *H. grandella* criadas en dieta natural y sintética, observó que la máxima pupación y emergencia de larvas criadas en dieta sintética ocurría a los 26 y 37 días respectivamente después de la oviposición. La máxima pupación y emergencia de larvas criadas en dieta natural ocurría a los 25 y 35 días después de la oviposición.

2.2.3 Medidas de control

Tillmans (57) divide los métodos de control y combate de *Hypsipyla* en tres categorías: a) protección de las semillas; b) protección en el vivero, y c) protección de bosques y plantaciones a base de prácticas culturales, control químico y control biológico.

2.2.3.1 Prácticas culturales

La adopción de prácticas de cultivo, ha sido investigada con el objeto de determinar su importancia como método de control. Cater (10) y FAO Staff (19) recomiendan la utilización

de buenos suelos, bien drenados, conjuntamente con una protección lateral de las plantas.

Experimentos realizados en Trinidad han demostrado que en plantaciones mixtas, las Meliáceas resultan menos atacadas que en plantaciones puras (19). Holdridge (31) y Cater (10) recomiendan una proporción de 60 a 100 cedros/ha. .

2.2.3.2 Control químico

Diversos productos químicos han sido utilizados, para tratar de controlar esta plaga. Ramírez (45) obtuvo un control de 100% con los insecticidas, Aldrin, Endrin, Telodrin, DDT y Fosferno cuando hacía tres aplicaciones a intervalos de seis días durante el período de oviposición.

Dourojeanni (15) encontró que Parathion da un control más efectivo que el DDT y ciertos compuestos arseniacales. En el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (3) se encontró que de 28 insecticidas sistémicos probados, sólo Carbofuran, Methonil, Fosfamidon, Monocrotofos e Isolan proporcionaban protección completa.

2.2.3.3 Control biológico

Debido a la dificultad extrema que existe en controlar *Hypsipyla* con insecticidas químicos por el poco efecto residual bajo climas tropicales con altas precipitaciones y su costo elevado, se ha pensado que el control biológico podría desempeñar un importante papel en el manejo de esta plaga.

Enemigos naturales de *Hypsipyla* han sido encontrados en diversas áreas de cultivo. Yaseen y Bennett (61) en muestreos realizados en vástagos y semillas infestadas encontraron varios parásitos pertenecientes a las familias Braconidae, Tachinidae, Chalcidoidea y Trichogrammatidae. ✕

En Turrialba, Costa Rica (6), se han encontrado varios parásitos de *Hypsipyla* pertenecientes a las familias Trichogrammatidae, Braconidae y Mermithidae.

Rao y Bennet (46) en su lista de enemigos naturales de *H. grandella* incluyen miembros de las familias: Braconidae, Ichneumonidae, Chalcidoidea y Tachinidae; incluyen además el nemátodo *Hexameris* spp., un dermáptero y el hongo *Cordyceps* spp.

Las posibilidades de control microbiológico de *Hypsipyla* se encuentran aún inexplotadas. El único trabajo que se ha encontrado en la literatura sobre pruebas de susceptibilidad de *Hypsipyla* a agentes patógenos es el de Kandasamy (34) el cual encontró que *Beauveria tenella* (Delacroix) fue capaz de infectar larvas de *Hypsipyla robusta* (Moore) cuando las esporas fueron inyectadas o administradas superficialmente.

✕ El interés en insecticidas microbiológicos ha incrementado debido a la resistencia de las plagas a insecticidas químicos, aparición de plagas secundarias como resultado de la destrucción de enemigos naturales y a la acumulación de residuos tóxicos en agua, suelos, plantas y animales (35).

El control de insectos mediante el uso de microorganismo patógenos ha sido considerado como una parte del

complejo ecológico y muchos de los principios y disposiciones que gobiernan la utilización de insectos parásitos y predadores para el control de insectos se aplican también en el control mediante el uso de microorganismos (28).

En las investigaciones sobre control microbiológico se incluyen estudios que son básicos a cualquier aplicación del método, pero las cuales no necesariamente reportan resultados utilitarios inmediatos. Entre dichos estudios básicos se encuentran investigaciones puras acerca de taxonomía, biología, comportamiento, métodos culturales tanto del organismo de combate como del insecto a combatir (4).

En el campo del control microbiológico dichos estudios básicos son fundamentales, por ejemplo, en la determinación de la susceptibilidad de insectos a patógenos, casi siempre se prefiere iniciar las pruebas, en experimentos de laboratorio, siendo los resultados una indicación del grado de susceptibilidad del insecto al patógeno, sirviendo como guía hacia subsecuentes pruebas de campo con el organismo (29).

La determinación del tamaño de cápsula cefálica y número y tiempo de duración de los diferentes estadios, constituyen información fundamental en trabajos entomológicos. Estos datos son requeridos para el estudio y aplicación de medidas de control (16). Asimismo, la determinación de las fases es importante para la evaluación de los efectos de organismos causantes de enfermedades (42). El concepto de Dyar (17) acerca de la progresión geométrica que presenta el tamaño de cápsulas cefálicas,

a través de las fases, . puede ser utilizado en la determinación del número de ellas.

Las pruebas biológicas de cualquier insecticida deberán ser conducidas, bajo condiciones estrictamente controladas tales como una preparación pura del patógeno, un insecto prueba uniforme y de la misma fase (35). Entre dichas pruebas biológicas la determinación de la DL_{50} es considerada la mejor medida cuantitativa de la patogenicidad de un organismo sobre un huésped dado (29), dicha dosis es también usada para comparar organismos entomógenos.

2.2.3.4 Aplicación de las radiaciones en el combate de insectos

La habilidad de un patógeno en persistir bajo condiciones ambientales en que vive el huésped es especialmente importante en el control temporal o permanente de las plagas. Los factores ambientales críticos que se oponen a dicha persistencia son desecación, radiación solar y temperatura. En general los patógenos 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 (35). Diversos experimentos se han llevado a cabo con el fin de estudiar la influencia de condiciones ambientales tanto en el almacenaje, como en el campo (12, 44, 60). Toumanoff (58) encontró que conidias de hongos son incapaces de infestar insectos después de una exposición de tres horas a la luz solar.

La luz solar tiene un marcado efecto de inhibición de la tasa de crecimiento de los hongos. Estudios cualitativos han demostrado que este efecto es debido a radiaciones de

baja longitud de onda (52). Los efectos de la luz ultravioleta en sistemas biológicos se explican mediante cambios específicos en la naturaleza química y física del ácido deoxirribonucleico (ADN). Los cambios químicos que se llevan a cabo sobre los constituyentes del ADN, deoxirribosa, purinas, y principalmente sobre las pirimidinas, son de naturaleza variada: formación de productos de hidratación, formación de dímeros tipo ciclobutano de timina, citosina y uracilo, formación de varios tipos de fotoproductos, reducción del peso molecular del ADN, ligamiento de cadenas de ADN, ligamiento de cadenas de ADN a cadenas de proteínas. El daño a un nucleótido puede ser letal o bien una mutación no letal, detectable por una prueba biológica (53).

Un conocimiento básico en estudios fotobiológicos, es la determinación de curvas de dosis-efecto. La dependencia de la viabilidad a los incrementos de dosis de radiaciones provee una indicación de la sensibilidad del sistema y ayuda a determinar los parámetros envueltos.

Al igual que la luz ultravioleta, los rayos gamma están compuestos de fotones, con energía 10^4 veces mayor que la energía de la radiación ultravioleta. En consecuencia la absorción de un fotón de rayos gamma, produce ionizaciones debido a la pérdida de electrones orbitales de la molécula.

Las radiaciones ionizantes son menos selectivas que las ultravioleta, pero en ambas el blanco principal de los efectos es el ADN. Los efectos en el ADN son variados, ruptura de los enlaces de hidrógeno, degradación de las bases nucleicas y escisión de la

cadena la cual está mayormente correlacionada con la inactivación biológica (53).

De todos los trabajos verificados acerca del efecto germicida de los rayos solares, se desprende la importancia de procurar una mayor resistencia de los organismos a la luz solar. Esta resistencia puede ser lograda provocando mutantes resistentes a la radiación.

La irradiación de hongos como grupo ha recibido relativamente poca atención comparado con bacterias, debido quizás a que los hongos tienen menos significancia en la salud pública (14).

El uso de radiaciones en el combate de insectos no está restringido al control de la plaga en sí, ejemplo, esterilización de machos, sino que puede también usarse aumentando la patogenicidad de organismos que parasitan dichas plagas.

La importancia de las radiaciones en el campo de la patología de insectos es grande, ya que con su concurso se puede obtener:

- a) mutantes de coloración diferente al estado silvestre, los cuales de conservar su patogenicidad podrían ser usados y evaluados de manera satisfactoria y
- b) mutantes resistentes a las radiaciones, los cuales persistirían mayor tiempo en el campo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del Estudio

El presente trabajo se llevó a cabo bajo condiciones ambientales en los laboratorios del Programa de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica.

3.2 Cultivo del Hongo

El hongo *M. anisopliae* fue suministrado por el Dr. D. W. Roberts del Instituto Boyce Thompson de Nueva York, EE.UU. Este hongo fue cultivado rutinariamente en tubos inclinados con un medio de cultivo denominado SDAY (Agar de Sabouraud con dextrosa y extracto de levadura) (48) e incubados a temperaturas de 28 a 30°C.

En los experimentos preliminares de patogenicidad las esporas fueron cosechadas añadiendo a cada tubo 6 ml de agua esterilizada más dos gotas de una suspensión dispersante de Triton X-100, agitando con un vibrador Vortex y filtrando dos a tres veces a través de varias capas de tela fina colocadas en un soporte Millipore. Cada filtrado se observó bajo un microscopio compuesto Zeiss para asegurarse que la preparación estaba libre de micelio.

Posteriormente se encontró un procedimiento de cosecha de esporas, mediante el cual se podía conservar éstas en seco y sin contaminación. Los tubos después de un mes de sembrados con el hongo, fueron golpeados suavemente contra el filo de una superficie de madera, a fin de que las esporas se soltaran del medio y se depositaran en el fondo del tubo; seguidamente éstas eran transferidas a recipientes de vidrio estériles y secos y almacenados en refrigeración y a temperatura de salón.

Para poner las esporas en suspensión se pesaba 0,5 gramo, se le añadía 50 cc de agua esterilizada más 1 gota de Tritón X-100 puro y se licuaba por dos minutos en un homogenizador SERVALL Omni-mixer en marca de 100. El homogenizado era observado al microscopio para constatar la pureza y ausencia de grumos en la preparación.

La concentración total de esporas, fue determinada con un hemocitómetro. La viabilidad fue determinada por dilución, y cultivo de las esporas en platos Petri con el mismo agar. Este procedimiento de preparación de la suspensión de esporas fue normalizado para todos los experimentos.

3.3 Cría del Insecto

Las larvas de *H. grandella* utilizadas en la realización del presente estudio fueron proveídas por la sección de crianza de dicho barrenador, la cual opera en este centro desde mediados del año 1970 y tiene por función suplir el insecto para propósitos de investigación. Dichas larvas fueron traídas de parcelas experimentales de cedro y caoba del Departamento de Ciencias Forestales Tropicales del IICA.

En el Cuadro 1 se detallan los diversos tipos de dieta utilizadas, las cuales fueron preparadas empleando una licuadora Osterizer. Dichas fórmulas son modificaciones de una dieta para *Heliothis* spp. suministrada por el Dr. M. J. Lukefahr*.

* M. J. Lukefahr, Comunicación personal, 1970. USDA, Brownsville, Texas, EE.UU.

Cuadro 1. Dietas utilizadas para la alimentación de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller en las diferentes pruebas de patogenicidad

Ingredientes	D i e t a			
	1	2	3	4
Harina de soya	80,7 g	80,0 g	-	80,0 g
Agar	8,0 g	10,0 g	6,6 g	10,0 g
Germen de trigo	36,0 g	-	53,0 g	-
Zuro molido	80,0 g	-	53,0 g	-
Acemite	-	75,0 g	-	75,0 g
Frijoles húmedos	-	-	53,0 g	-
Levadura (Brewer's)	-	-	33,0 g	-
Alfacel	-	15,0 g	-	15,0 g
Azúcar	-	80,0 g	-	40,0 g
Testone S-150	-	20,0 g	-	-
KOH, 4 M	6,0 ml	5,0 ml	-	5,0 ml
Sal W	10,0 g	5,0 g	-	5,0 g
p-hidroxibenzoato de metilo	1,8 g	-	2,1 g	-
Acido sórbico	1,1 g	1,0 g	1,1 g	1,0 g
Formaldehido al 10%	5,0 ml	5,0 ml	12,0 ml	5,0 ml
Acido acético al 25%	13,3 ml	10,0 ml	-	10,0 ml
Mezcla de vitaminas*	20,0 g	-	-	15,0 g
Aureomicina	167,0 mg	46,0 mg	-	46,0 mg
Cápsula de Kanamicina	-	-	1,0	-
Acido p-hidrobenzoico	-	1,0 g	-	1,0 g
Benzoato de sodio	-	1,0 g	-	1,0 g
Acido ascórbico	-	0,5 g	3,5 g	0,5 g

* Esta es una mezcla vendida por Nutritional Biochemical Corporation bajo el nombre de Vitamin Diet Fortification Mixture.

3.3.1 Determinación del número de fases de *H. grandella*

Con el objeto de determinar el número de fases se procuró un dispositivo el cual permitía mantener las larvas confinadas individualmente. Observaciones diarias se realizaron a fin de determinar el momento de la muda. Las larvas fueron medidas al momento de la eclosión y después de cada ecdisis, a fin de facilitar y precisar la medición se utilizó eter para adormecer las

larvas. De igual forma las cápsulas cefálicas fueron colectadas y medidas en su largo y ancho. Registro del tiempo transcurrido entre ecdisis y período de pupación fueron tomados.

Curvas de crecimiento estimadas fueron obtenidas de valores observados, ajustando la función logística

$$Y = \frac{B_0}{1 + B_1 e^{-B_2 t}}$$

donde::

Y = longitud esperada en mm

t = edad de la larva

B₀ = Y max = longitud máxima de larvas

B₁ = constante relacionada con el tamaño de la larva al tiempo de eclosión

B₂ = constante de crecimiento exponencial

Con los valores ajustados se estimó una curva de crecimiento promedio.

Análisis de correlación fue efectuado entre largo de cuerpo contra largo y ancho de cápsulas cefálicas para tratar de establecer la medida en que estas variables están asociadas.

3.4 Métodos Generales de Inoculación

La suspensión de esporas preparada según indicación en sección 3.2 fue utilizada y puesta sobre el insecto siguiendo los procedimientos a) inmersión de las larvas en la suspensión por un minuto y b) aspersion, por medio de un atomizador manual.

3.4.1 Prueba preliminar de patogenicidad del hongo *M. anisopliae* sobre *H. grandella*

Sesenta larvas de 15 a 17 días de edad, criadas únicamente en dieta artificial, fueron divididas al azar en dos grupos de 30. Un grupo fue tratado con una suspensión de esporas a una concentración de esporas viables de $1,2 \times 10^7$ por mililitro, y el otro grupo, el control, fue tratado con agua más Tritón X-100. Cada grupo a su vez fue subdividido en tres subgrupos de nueve larvas y uno de tres.

Cada subgrupo de larvas fue bañado durante un minuto en la suspensión correspondiente y después colocado en compartimentos en platos Petri conteniendo dieta artificial #1.

Tanto las larvas tratadas como el grupo control fueron observadas inicialmente todos los días, por espacio de doce días, y después cada dos días hasta emergencia de los adultos. Se llevó un registro del número de larvas que se mueren con el tiempo; número de larvas que empupan y del número de larvas que emergen. Asimismo, se realizaron anotaciones del comportamiento o actividad de las larvas. Las larvas muertas fueron separadas y puestas en platos Petri con un papel humedecido para observar el desarrollo del hongo.

3.4.2 Prueba de patogenicidad de *M. anisopliae* sobre las diferentes fases de *H. grandella*

En este experimento se tomaron 126 larvas de cada uno de las seis diferentes fases, seleccionadas de acuerdo al tamaño de la cápsula cefálica. La sexta y séptima fase se consideró como

un solo grupo debido a que no todas las larvas pasan a la séptima fase.

Cada fase se dividió en dos grupos de 63 larvas cada una: un grupo a ser tratado y un grupo de control. El grupo tratado se inoculó por aspersión en una concentración de esporas de $9,2 \times 10^7$ conidias viables por ml. El grupo de control fue tratado con agua más Tritón X-100.

Después del tratamiento las larvas se colocaron en platos Petri con nueve compartimientos individuales conteniendo dieta artificial #4. Cada plato Petri constituyó una observación experimental. Cada tratamiento consistía entonces de siete repeticiones de nueve larvas cada una.

Los resultados experimentales se anotaron a los siete y a los 14 días. Las pruebas preliminares indicaron que a la semana después del tratamiento se obtiene la mayor frecuencia de mortalidad, y que a las dos semanas se alcanza mortalidad total.

Se llevó registro del número de larvas muertas naturalmente; atacadas por el hongo; desaparecidas y larvas que empupan.

Todos los datos de mortalidad fueron calculados usando la fórmula de Abbott (1) la cual establece que en la evaluación de la efectividad de un insecticida, las muertes naturales deben ser consideradas. Dicha fórmula puede expresarse como sigue:

$$X_i = \frac{X_i - Y_i}{X_i} \times 100$$

donde:

X_i = número de vivos en el grupo control

Y_i = número de vivos en el grupo de tratados

$X_i - Y_i$ = mortalidad causada por el tratamiento

Z_i = por ciento de mortalidad corregida.

3.4.3 Determinación de dosis letal-50

La determinación de DL₅₀ se realizó sobre la fase más susceptible. Quinientos noventa y cuatro larvas en quinta fase, fueron divididas en seis lotes de 99 larvas cada uno. Este número se considera adecuado para el análisis estadístico y fue derivado de trabajos verificados por De Armon y Lincoln (13) acerca del número de animales requeridos en ensayos con patógenos. La determinación del número total de animales necesarios puede obtenerse de la siguiente ecuación:

$$N = \frac{38}{L^2 B^2}$$

donde:

L = magnitud del error

B = pendiente de la curva de dosis-respuesta

N = número total de animales

El valor del numerador en la expresión varía con el intervalo de confianza que se establezca, influenciando directamente al número total de animales requeridos.

Cada lote de larvas fue tratado con una suspensión de esporas viables correspondientes a: $3,2 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,6 \times 10^7$, $0,9 \times 10^7$ y $0,4 \times 10^7$ por mililitro. El control fue tratado con agua más Tritón X-100.

Cada grupo de larvas, fue subdividido en 11 subgrupos de nueve larvas cada uno. Cada subgrupo de larvas fue inoculado por inmersión y después colocados en platos Petri conteniendo dieta artificial #4.

Las observaciones fueron hechas a los siete y 14 días después del tratamiento, habiéndose llevado registro del número de larvas muertas naturalmente, número de larvas muertas por el hongo, número de larvas desaparecidas y número de larvas que empupan. La mortalidad fue calculada por la fórmula de Abbott (1) y el probit empírico obtenido de tablas estadísticas (21).

3.5 Métodos de Irradiación

3.5.1 Irradiación ultravioleta

Una porción de 10 ml de la suspensión preparada según indicación en la sección 3.2, fue colocada en un plato Petri y expuesta a una intensidad de radiación ultravioleta de 17,5 ergios/mm²/seg. La suspensión se mantuvo agitada usando una plataforma rotatoria Eberbach, durante el tiempo de exposición. La irradiación fue efectuada por medio de una lámpara germicida modelo G15T8 de la General Electric la cual emite la mayor parte de la energía ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

Después de irradiada la suspensión se sembraba en diferentes diluciones en agar de Sabouraud con levadura, para determinar el número de sobrevivientes. Los platos sembrados eran colocados en una estufa a 30°C donde se incubaban por espacio de tres días al cabo de los cuales se efectuaba el contaje de colonias viables en un cuenta bacterias.

3.5.2 Irradiación gamma

Las condiciones de cultivo, cosecha, almacenaje y preparación de la suspensión de esporas fueron similares a las descritas en la sección 3.2.

Tubos de 50 ml, conteniendo 35 ml de suspensión de esporas eran introducidos en envases metálicos y sumergidos en una pila, a fin de ser expuestos a las radiaciones gamma emitidas por el elemento ^{60}Co . La intensidad de la fuente era de 1,4 kr/minuto.

Después de irradiada la suspensión, se efectuaban las diluciones y siembra. Los platos sembrados eran colocados en una estufa a 30°C donde se incubaban por tres días, al cabo de los cuales se efectuaba el contaje de colonias visibles.

4. RESULTADOS

4.1 Prueba Preliminar de Patogenicidad del Hongo *M. anisopliae* sobre *H. grandella*

Las larvas atacadas por el hongo fueron reconocidas por su decoloración, turgidez y rigidez. Dentro de las 24 horas subsiguientes el micelio blanquecino del hongo empezó a emerger a través de las pseudopatas y espiráculos. Con el transcurso de la enfermedad el cadáver entero es cubierto por la muscardina que al esporular cambia a color verde oscuro, Figura 1a. La larva muerta se transforma completamente en una masa de esporas que al final se desintegra con el más leve movimiento, Figura 1b.

La mortalidad de las larvas se muestra en el Cuadro 2. Se puede apreciar que bajo las condiciones del experimento 50 por ciento de las larvas fueron atacadas por el hongo. Larvas perdidas se refiere a larvas que desaparecieron porque escaparon o por canibalismo.

De las pupas formadas el 90% llegó al estado de adulto en ambos grupos.

La distribución del número total de larvas muertas con respecto al tiempo transcurrido después de la inoculación se presenta en la Figura 2. Se puede observar que el mayor número de larvas muertas se presentó al sexto día después del tratamiento.

La mortalidad de larvas en ambos grupos se muestra en la Figura 3. La mortalidad causada por el hongo fue estimada en 50%.

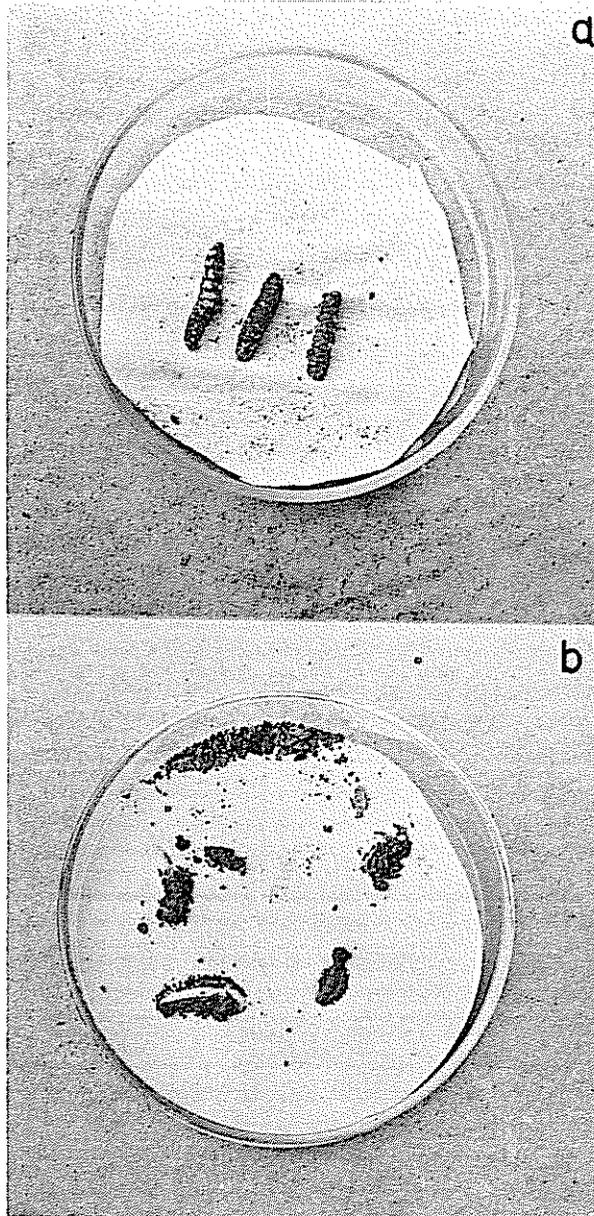


Fig. 1 Larvas de Hypsipyla grandella Zeller atacadas por el hongo Metarrhizium amisopliae (Metch.) muscardina verde

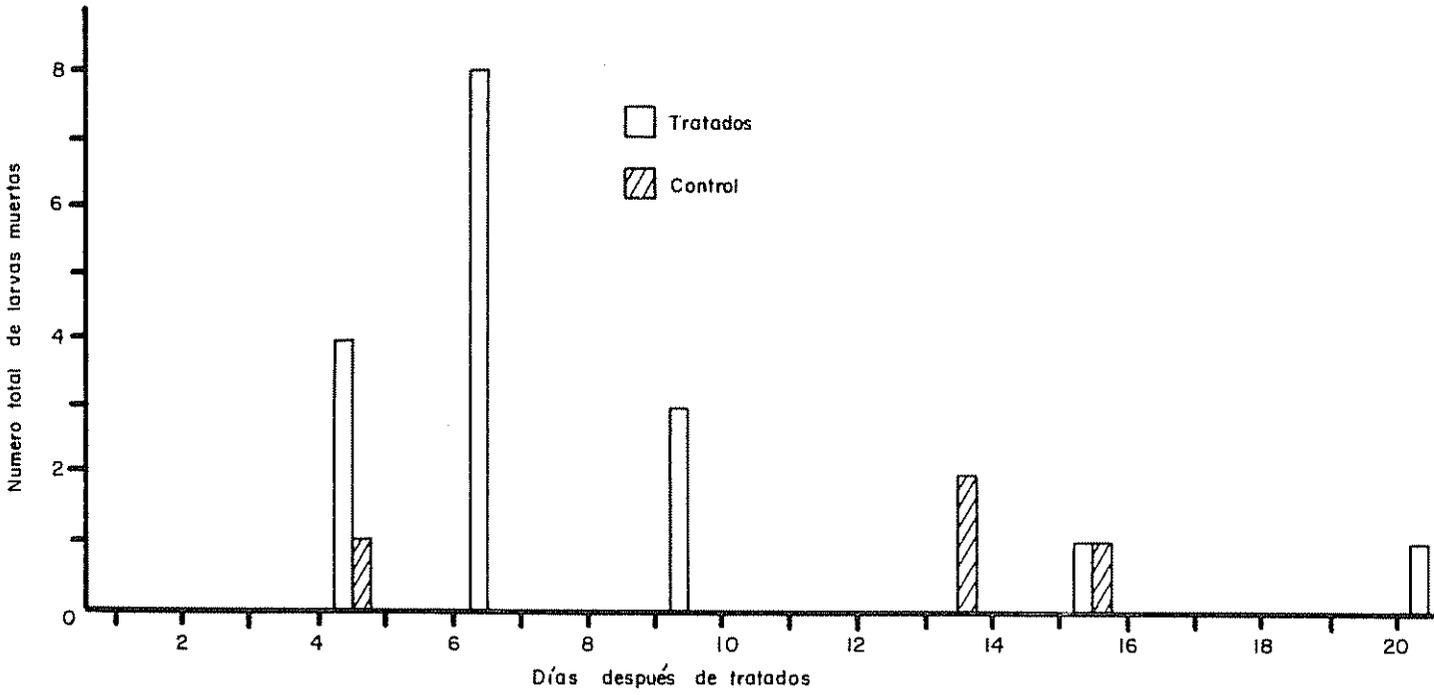


Fig 2 Distribucion de la mortalidad de larvas de Hypsipyla grandella Zeller atacadas por el hongo Metarrhizium anisopliae (Metch.) a una concentración de 1.2×10^7 esporas viables/ml

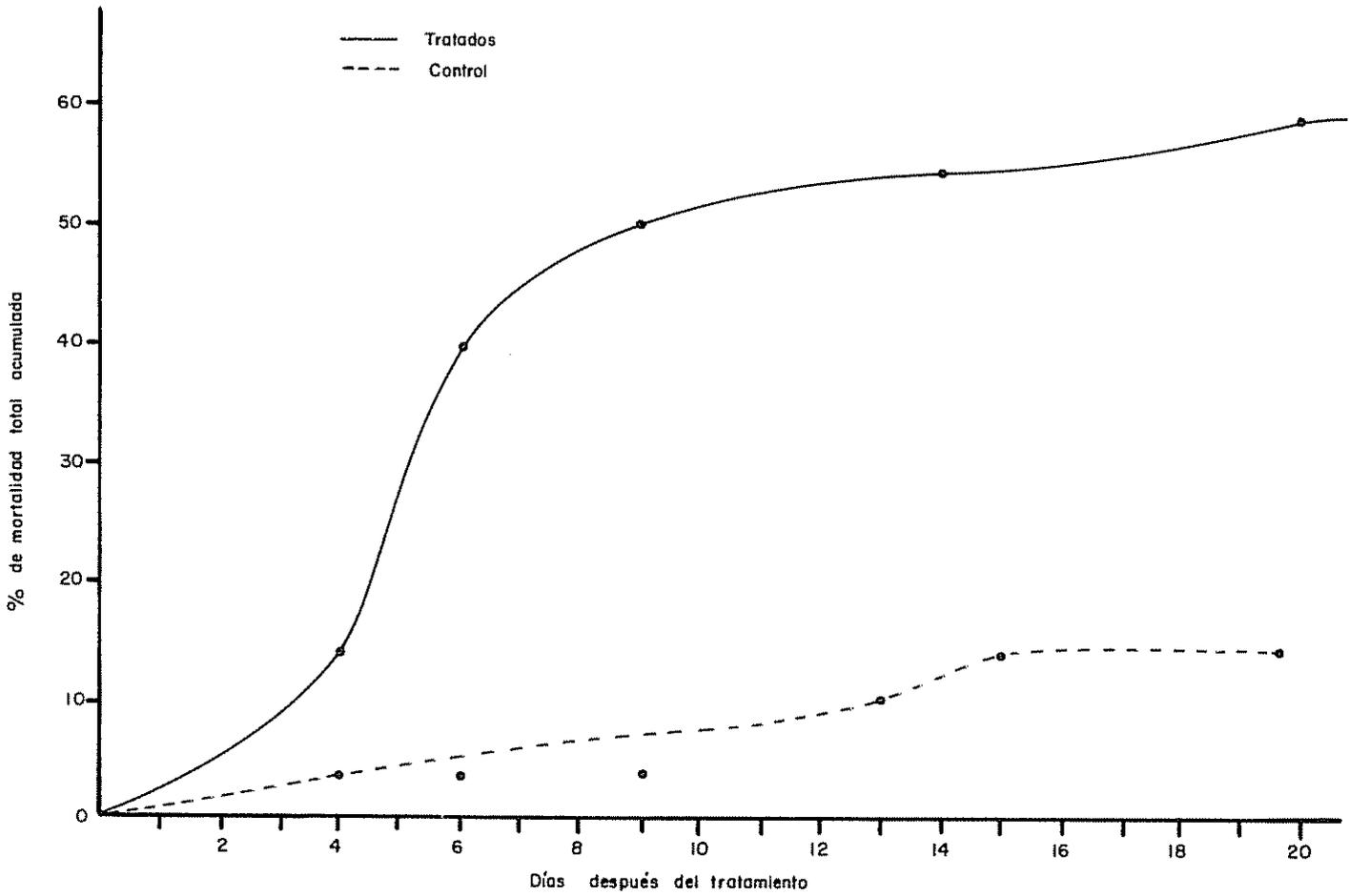


Fig 3 Porcentaje de mortalidad total acumulada de larvas de Hypsipyla grandella Zeller expuestas a esporas de Metarrhizium anisopliae (Metch)

Cuadro 2. Mortalidad de larvas de *Hypsipyra grandella* Zeller atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $1,2 \times 10^7$ esporas viables/ml.

No. de larvas	Total de larvas muertas	Larvas muertas por el hongo	Total de pupas	Total de adultos	Larvas perdidas
testigo					
9	1	0	6	6	2
9	1	1*	6	5	2
9	2	0	4	4	3
3	0	0	3	2	0
Total 30	4	1	19	17	7
tratadas					
9	5	3	2	1	2
9	6	6	3	3	0
9	6	6	1	1	2
3	0	0	3	3	0
Total 30	17	15	9	8	4

* Contaminación no controlada

Este experimento demuestra que las larvas de *H. grandella* son susceptibles al hongo *M. anisopliae*. Para las determinaciones de dosis letales 25, 50 y 75 se requiere que a continuación se determine cuales son las diferentes fases de *H. grandella*; y la fase más susceptible al hongo, el cual se utilizará en todas las futuras pruebas de patogenicidad.

4.2 Determinación del Número de Fases de *H. grandella*

El resultado de las observaciones periódicas efectuadas durante el ciclo larval de *H. grandella*, permitió determinar el tiempo transcurrido entre las diferentes ecdisis; dichas observaciones

se encuentran en el Cuadro 1 (Apéndice). Se puede observar que los períodos entre ecdisis tendían a ser más variables a medida que la edad de la larva aumentaba.

La Figura 4 muestra la distribución del tiempo transcurrido entre sucesivas ecdisis hasta la pupación de larvas de *H. grandella*; se puede deducir de dicha figura y de la observación de los tiempos medios transcurridos entre ecdisis, Cuadro 3, que el período entre eclosión y pupación dura 30 días, asimismo se puede notar en el Cuadro 3, que la variabilidad es máxima para el período comprendido entre la VI ecdisis y la formación de pupas.

Los valores obtenidos de la distribución del tiempo entre ecdisis sucesivas fueron comparados con distribuciones teóricas, habiéndose encontrado variabilidad en los ajustes: entre I y II, II y III, y IV y V ecdisis se encontró un mejor ajuste al modelo binomial, no así entre eclosión y I, III y IV y V y VI ecdisis las cuales no ajustaron al modelo binomial, ni al de poisson.

Cuadro 3. Valores promedios y desviación estandar del tiempo transcurrido entre ecdisis sucesivas hasta pupación de larvas de *H. grandella*. Los números romanos indican las diferentes ecdisis

	\bar{X}	s
Eclosión - I	3,00	0,00
I - II	3,87	0,80
II - III	3,48	1,30
III - IV	3,31	0,95
IV - V	3,90	1,20
V - VI	4,85	1,50
VI - Pupación	7,80	2,90

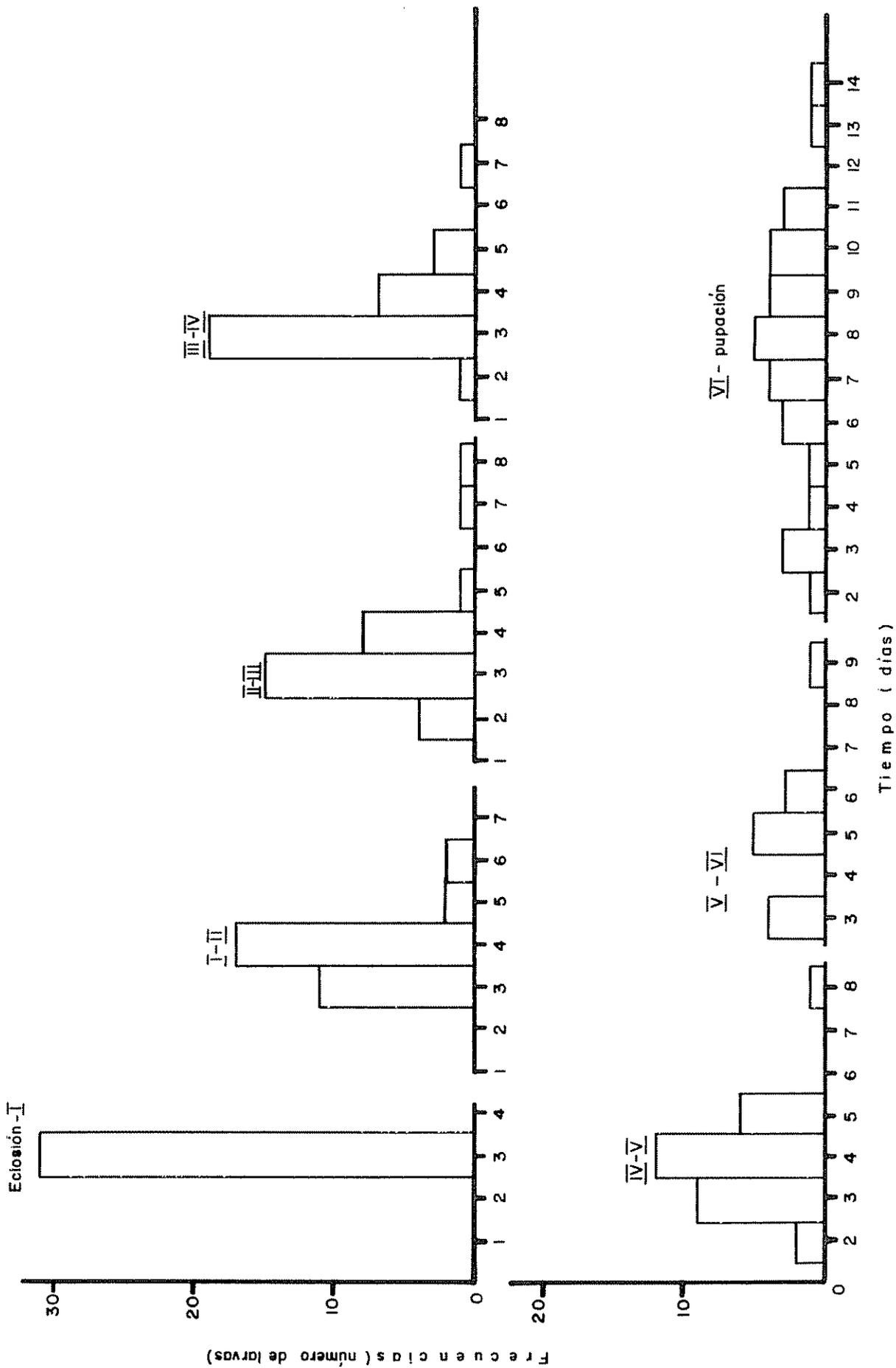


Fig. 4 Distribución del tiempo transcurrido entre ecdisis sucesivas hasta pupación de larvas de H. grandella. Los números romanos indican las diferentes ecdisis

La longitud del cuerpo de las larvas, al tiempo de efectuarse las diferentes ecdisis se presenta en el Cuadro 2 (Apéndice).

Se puede observar que existe un incremento en la variabilidad del tamaño de las larvas a medida que transcurren las sucesivas ecdisis, siendo notoria la ocurrencia de tamaños casi constantes durante las dos primeras ecdisis, aumentando la divergencia en tamaños en las siguientes ecdisis. El tamaño máximo alcanzado por las larvas fue de 26,4 mm, en tanto el mínimo fue de 15,0 mm.

La distribución del largo del cuerpo de larvas de *H. grandella*, al tiempo de ecdisis, se presenta en la Figura 5. El aumento en variabilidad de los tamaños a medida que transcurre el tiempo puede observarse en el Cuadro 4, el cual muestra valores de error estandar máximos para las últimas ecdisis.

Los valores obtenidos de la distribución del tamaño del largo del cuerpo de las larvas al tiempo de ecdisis fueron comparadas con distribuciones teóricas, habiéndose encontrado que el largo del cuerpo al tiempo de la III, IV, V y VI ecdisis se comportaban binomialmente, en tanto al momento de la I y II ecdisis, los largos no ajustaban a las distribuciones teóricas binomial y poisson.

Cuadro 4. Valores promedios y desviación estandar del largo (en mm) de cuerpo de larvas de *H grandella*, al tiempo de ecdisis. Los números romanos indican las diferentes ecdisis

	\bar{X}	s
I	2,39	0,01
II	4,62	0,75
III	7,56	1,90
IV	10,90	1,58
V	15,59	2,24
VI	20,31	3,13

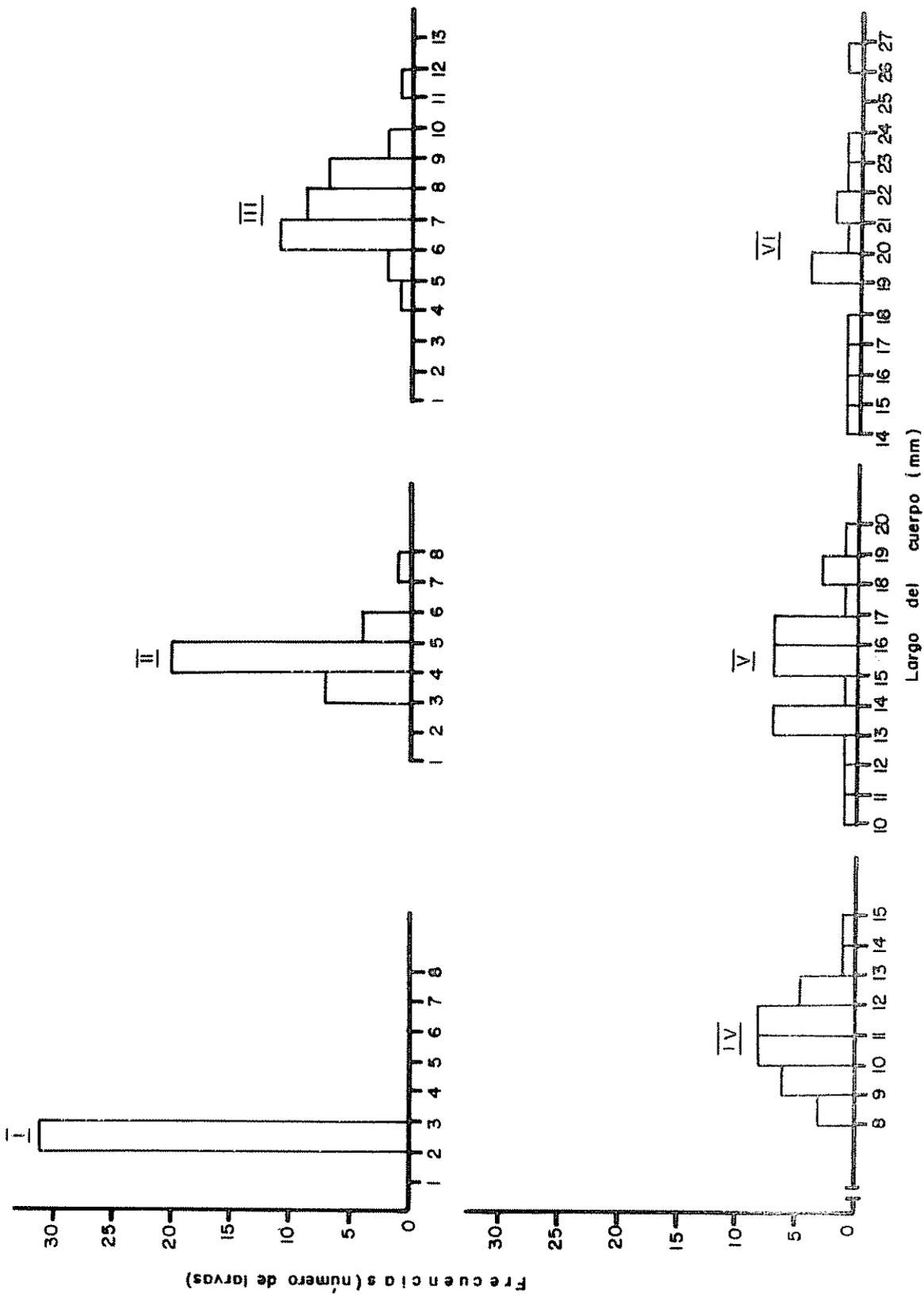


Fig. 5 Distribución del largo del cuerpo de larvas de *H. grandella* Zeller, al tiempo de ecdysis. Los números indican las diferentes ecdisis

Curvas de crecimiento para las 31 larvas fueron ajustadas a la ecuación logística, habiéndose logrado ajustes entre 95 y 99%, concentrándose dichos valores entre 98 y 99%. De las ecuaciones ajustadas y con los valores de los parámetros B_0 , B_1 y B_2 (Cuadro 3, Apéndice) se estimó una curva de crecimiento promedio para dichas larvas, la cual se muestra en la Figura 6. Se observa una gran variabilidad de tamaños presentados por las larvas al tiempo de ecdisis. La variabilidad es mínima para la primera ecdisis y aumenta progresivamente con la edad de la larva.

El resultado de las mediciones efectuadas sobre el largo y el ancho de las cápsulas cefálicas viene dado en el Cuadro 3 (Apéndice). Los valores de desviación estandar de las mediciones efectuadas sobre el ancho de las cápsulas cefálicas, Cuadro 5, indican que la variabilidad aumenta de la I a la VI ecdisis.

La distribución del ancho de cápsulas cefálicas de las larvas al tiempo de ecdisis se muestra en la Figura 7. La variabilidad de las mediciones se manifiesta por la dispersión de los datos. El ajuste de dicha distribución a modelos teóricos mostró también variabilidad, la I, IV y VI ecdisis se comportaron binomialmente, en tanto la III ajustó mejor a poisson. La II y V ecdisis no ajustaron a ninguna de las dos distribuciones.

La relación entre el ancho promedio de las cápsulas cefálicas y el tiempo promedio acumulado, obtenido de la Figura 4, se muestra en la Figura 8. Debido a la naturaleza discreta de dichos valores, la Figura 8 ha sido representada en forma escalonada, sin

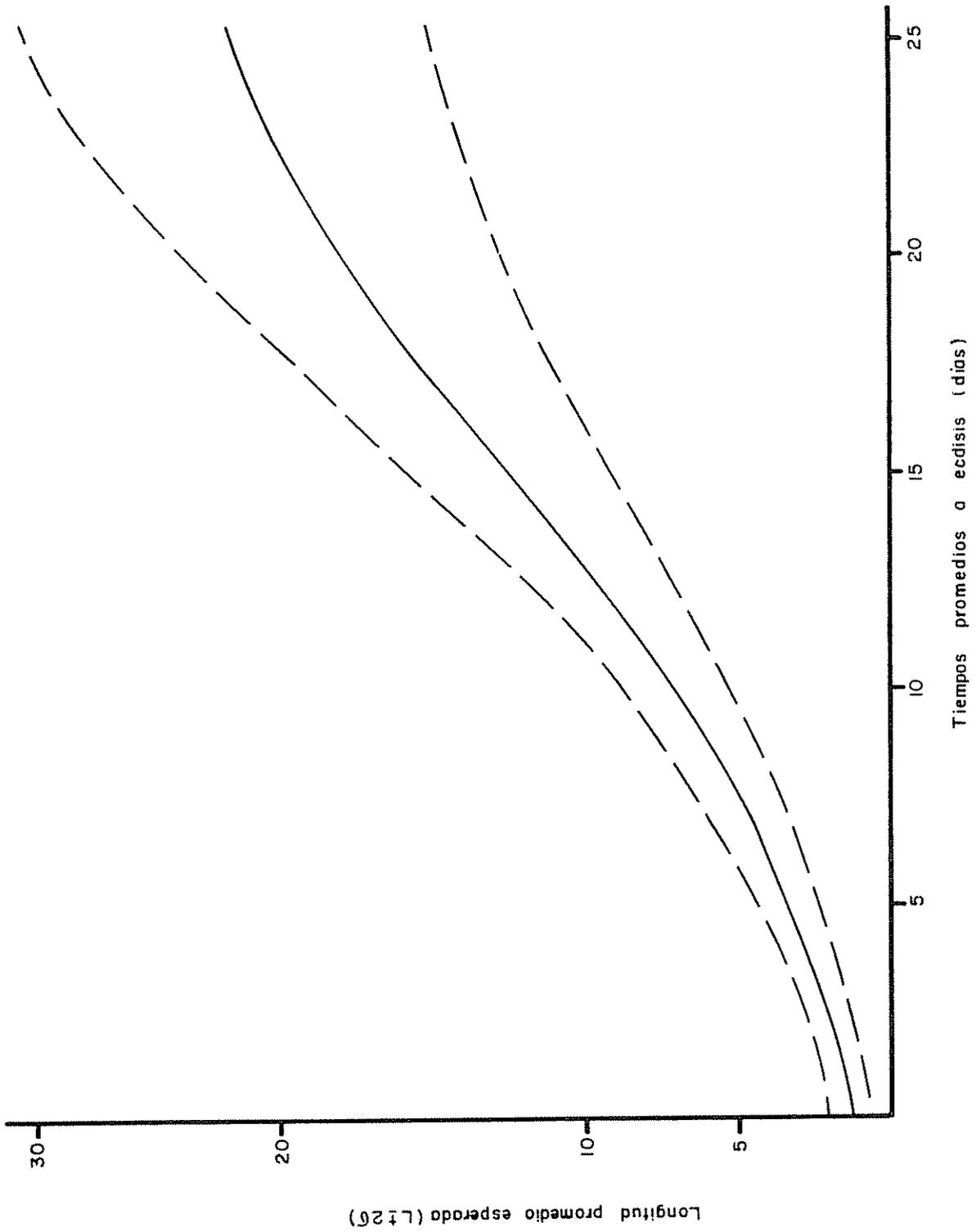


Fig. 6 Curva promedio de crecimiento de larvas de H. grandella y banda de confianza de 96,4%

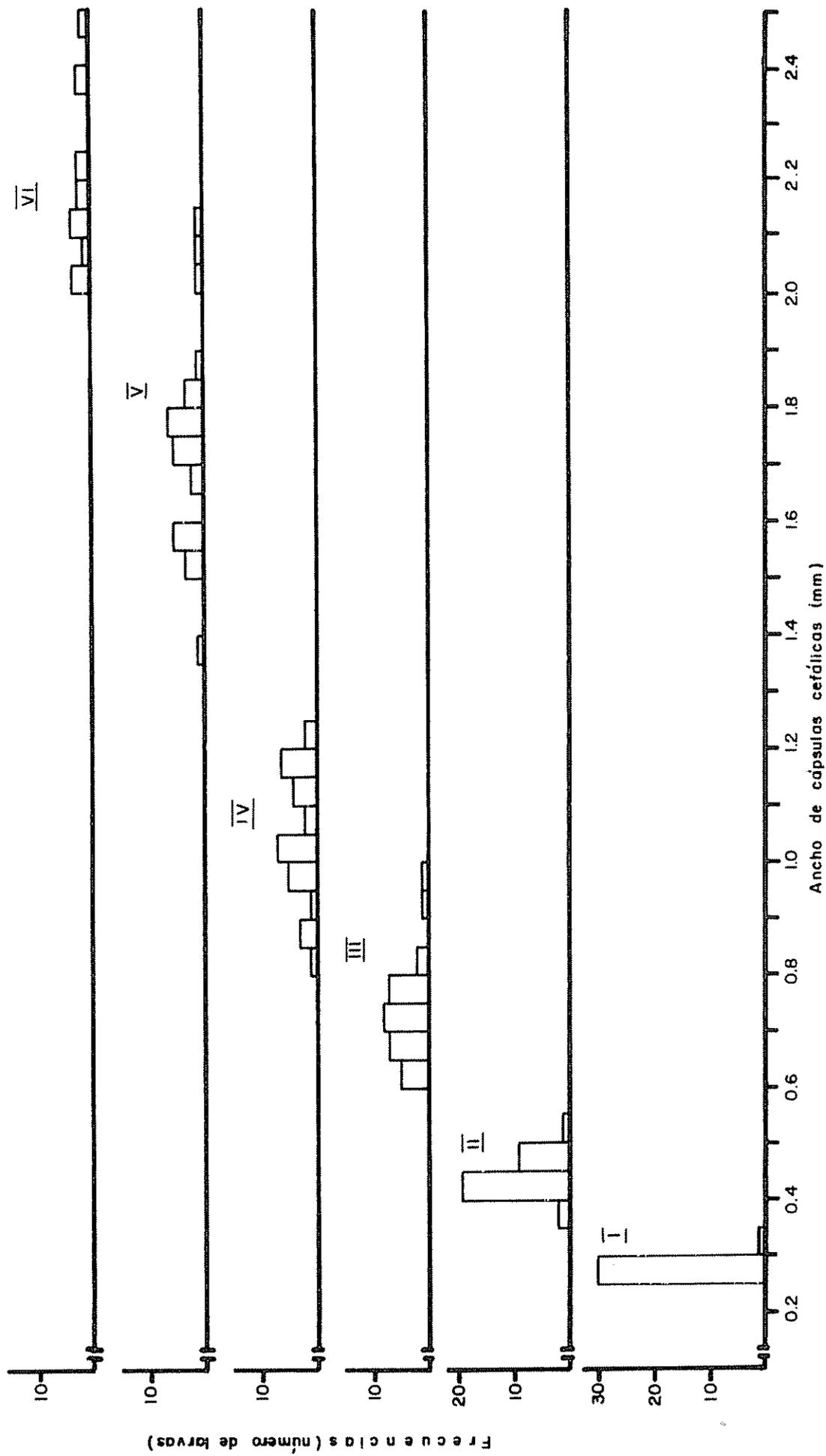


Fig. 7 Distribución del ancho de cápsulas cefálicas de *H. grandella* al tiempo de ecdysis.
 Los números romanos indican las diferentes ecdisis

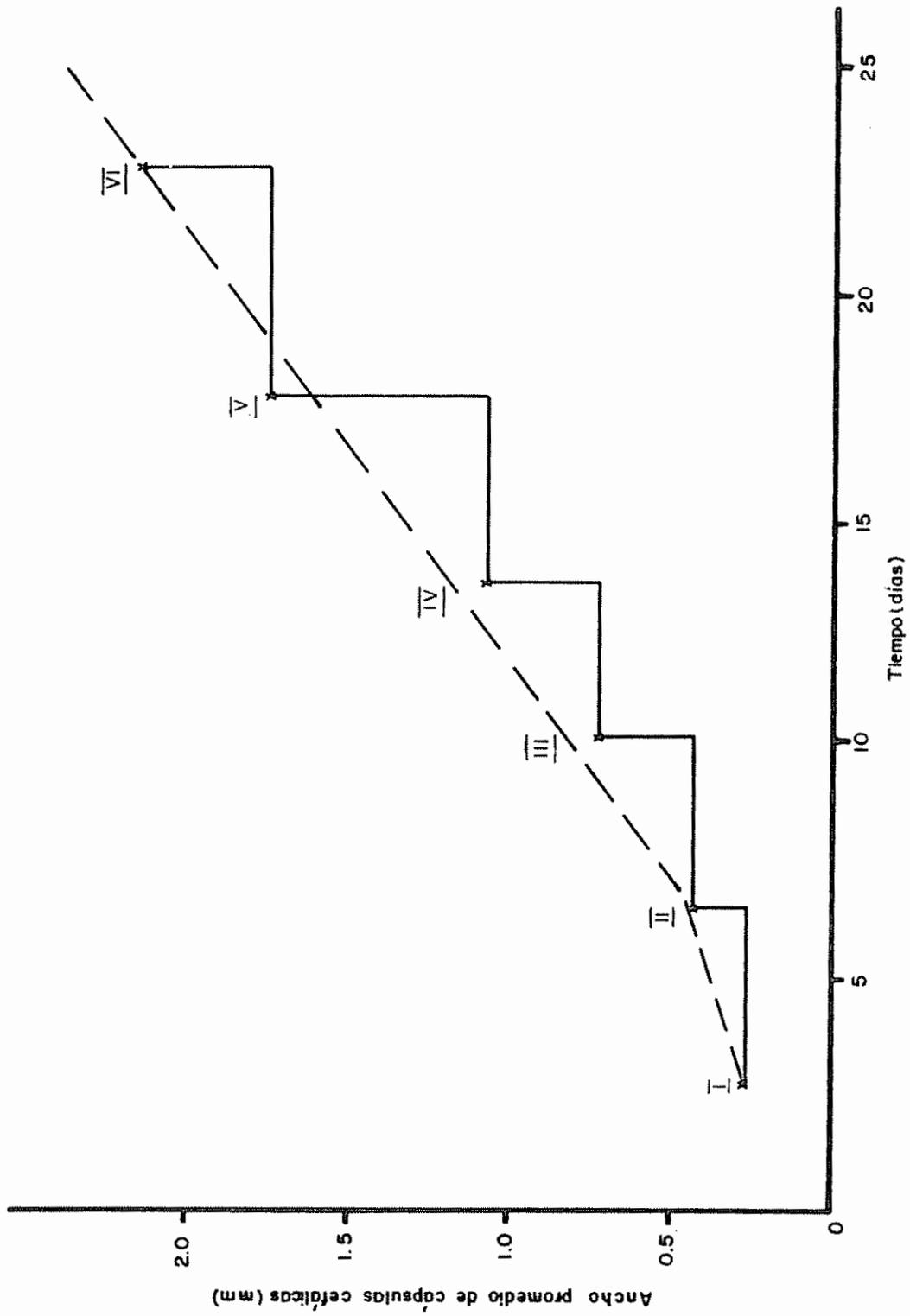


Fig. 8 Relación entre el ancho promedio de cápsulas cefálicas y el tiempo promedio de ecdisis.
 Los números romanos indican las diferentes ecdisis

Cuadro 5. Valores promedios y desviación estandar del ancho (en mm) de cápsulas cefálicas de *H. grandella* al tiempo de ecdisis. Los números romanos indican las diferentes ecdisis

	\bar{X}	s
I	0,28	0,001
II	0,44	0,003
III	0,73	00,006
IV	1,05	0,012
V	1,73	0,014
VI	2,18	0,016

Cuadro 6. Valores promedios y desviación estandar del largo (en mm) de cápsulas cefálicas de *H. grandella* al tiempo de ecdisis. Los números romanos indican las diferentes ecdisis.

	\bar{X}	s
II	0,37	0,003
III	0,63	0,007
IV	0,91	0,009
V	1,42	0,017
VI	1,80	0,015

embargo se puede observar que existe una relación casi lineal entre dichas variables, a partir de la II ecdisis; esta relación podría ser usada en la predicción aproximada de los tamaños de ancho de cápsulas cefálicas posteriores a la II ecdisis.

La Figura 9 muestra la distribución del largo de cápsulas cefálicas de *H. grandella* al tiempo de ecdisis. El Cuadro 6 muestra la variabilidad de esta medida conforme aumenta la edad de la larva.

El ajuste de las distribuciones observadas a modelos teóricos fue también variado, la IV ecdisis ajustó a binomial, la III y V

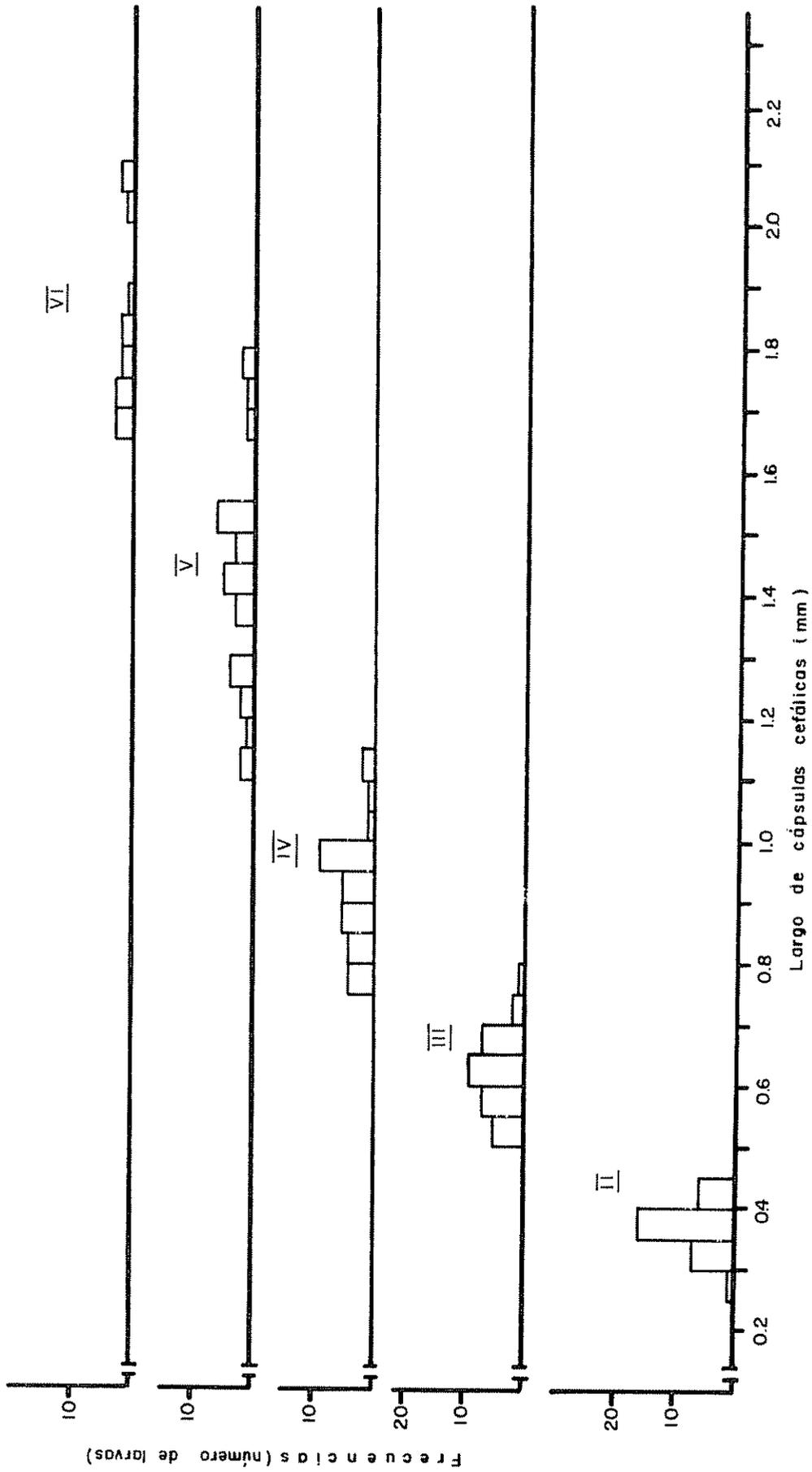


Fig. 9 Distribución del largo de cápsulas cefálicas de *H. grandella* al tiempo de ecdisis. Los romanos indican los diferentes ecdisis.

ecdysis a poisson, en tanto la II y VI ecdysis no ajustaron a ninguna de las distribuciones.

La relación entre el largo de cápsulas cefálicas y el tiempo promedio acumulado, obtenido de la Figura 4, se muestra en la Figura 10. Debido a la naturaleza discreta de los valores del largo de cápsulas cefálicas, la Figura 10 ha sido representada en forma escalonada, sin embargo, se puede observar que existe una relación lineal entre dichas variables, a partir de la II ecdysis. La gráfica no muestra los valores del largo de las cápsulas de la I ecdysis, por no haberse tomado.

Los resultados del análisis de correlación efectuado para determinar el grado de asociación entre el largo del cuerpo de las larvas y el largo y ancho de las cápsulas cefálicas indicó que únicamente existe estrecha correlación entre largo y ancho de las cápsulas cefálicas en la III, IV, V y VI ecdysis, habiéndose obtenido valores de R^2 de 89,0, 89,5, 93,9 y 93,2 % respectivamente para dichas asociaciones. El bajo porcentaje de asociación entre el largo de cuerpo y el largo o ancho de cápsulas cefálicas indica la imposibilidad de poder detectar la fase por medio del tamaño del cuerpo, requiriéndose por consiguiente, que dicha determinación se haga utilizando el tamaño de la cápsula cefálica.

4.3 Pruebas de Patogenicidad de *M. anisopliac* sobre las diferentes fases de *H. grandella*

La mortalidad de larvas en primera fase se muestra en el Cuadro 5 (Apéndice). Se puede apreciar que bajo las condiciones del experimento ninguna de las larvas fue atacada por el hongo.

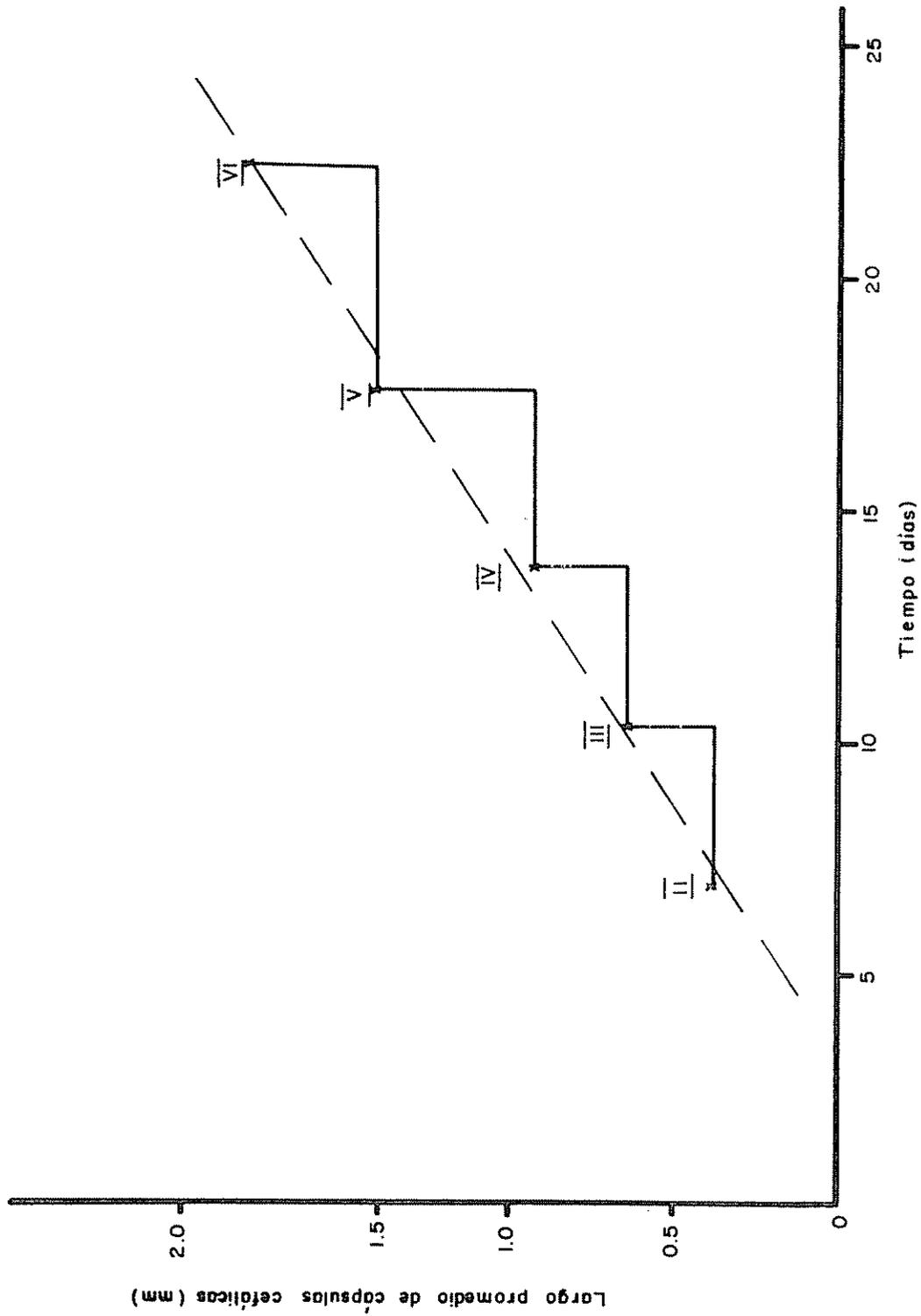


Fig. 10 Relación entre el largo promedio de las cápsulas cefálicas y el tiempo promedio de ecdisis. Los números romanos indican las diferentes ecdisis

También se puede apreciar que el número de larvas que se murieron por causas naturales, y el número de larvas perdidas fue similar en el control y en el grupo tratado.

La mortalidad ocurrida en larvas de segunda fase también fue de 0,0%, Cuadro 6 (Apéndice).

En el grupo de larvas en tercera fase hubo una mortalidad causada por el hongo de 5,3%, Cuadro 7 (Apéndice). Larvas en cuarta fase mostraron un 7,0% de mortalidad, Cuadro 8 (Apéndice). Larvas en quinta fase mostraron un 32,1% de mortalidad, Cuadro 9 (Apéndice). Larvas de sexta y séptima fase mostraron un 18% de mortalidad causada por el hongo, Cuadro 10 (Apéndice).

Los datos de mortalidad debida al tratamiento, se presentan en la Figura 11, y demuestran a simple observación que el período larval de *H. grandella* más susceptible al hongo *M. anisopliae* es la quinta fase. Estos datos también fueron analizados de acuerdo a un diseño irrestrictamente al azar con seis tratamientos (las fases) y siete observaciones (los siete platos con compartimentos). Los resultados del análisis de variancia indica que existen diferencias grandes en susceptibilidad entre las diferentes fases de *H. grandella* Zeller.

Para comprobar que la primera y segunda fase eran verdaderamente resistentes al ataque por el hongo se llevaron a cabo pruebas de inoculación por inmersión de los huevos, por espolvoreo y por aspersión. En ninguna ocasión se logró la infección del primer estadio larval. En una de las pruebas se logró, sin embargo, la infección de una larva en segunda fase, Figura 12.

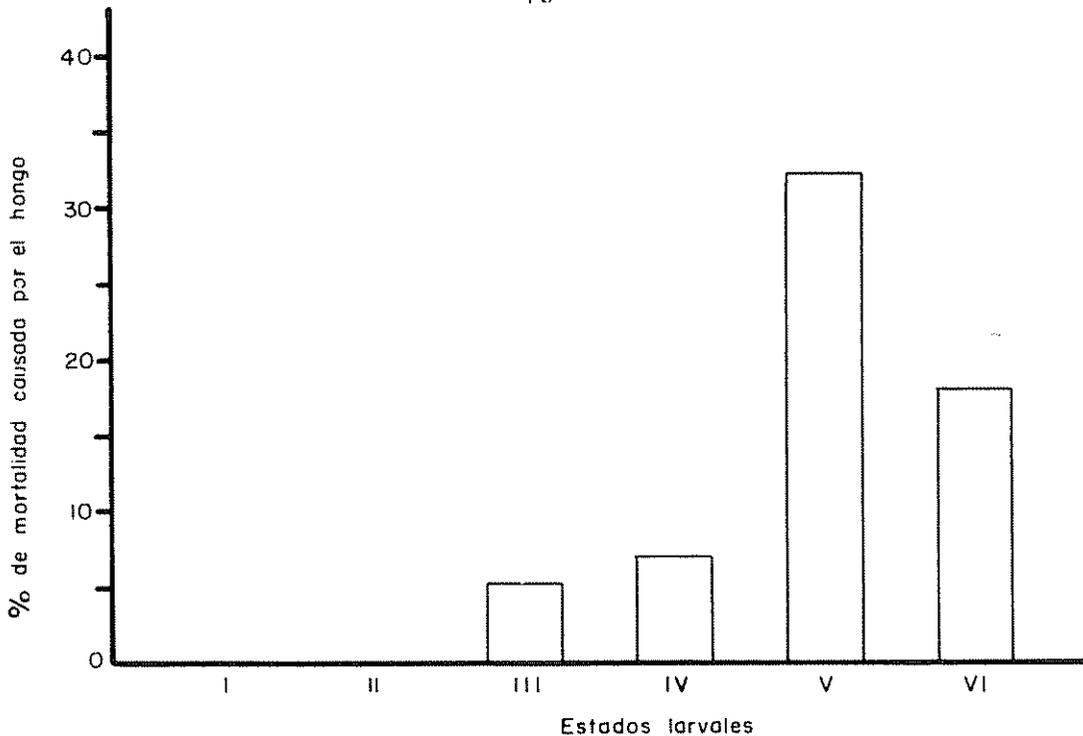


Fig II Distribución de la mortalidad causada por el hongo M. anisopliae sobre los diferentes fases de H. grandella

Estos experimentos han demostrado estadísticamente que la V fase de *H. grandella* es la más susceptible al ataque del hongo *M. anisopliae*.

4.4 Determinación de Dosis Letal 25, 50 y 75

Los resultados de este experimento se muestran en el Cuadro 7.

La línea de regresión calculada para los valores de dosis-mortalidad de *M. anisopliae* sobre *H. grandella* está dada en la Figura 13. Un exámen del valor de r^2 para heterogeneidad, muestra un ajuste de 99,5% de los datos experimentales con respecto a la línea recta de regresión. Los datos encontrados para la ecuación de regresión fueron: $Y = 3,75 + 0,80 \log Ci$ donde Y es la mortalidad en unidades de Probitas y Ci es la concentración de esporas



Fig. 12 Diferentes fases de Hypsipyla grandella Zeller atacadas por el hongo Metarrhizium amisopliae (Metch) a una concentración de 8.3×10^7 esporas viables /ml

Cuadro 7. Mortalidad de larvas de *H. grandella* en V fase a los 15 días de tratadas con diferentes concentraciones de esporas de *H. anisopliae*

Esporas viables por ml	Número de larvas tratadas	Total larvas muertas	Larvas matadas por el hongo	Larvas desapa- recidas	Larvas vivas	Pupas encon- tradas	Por cien- de mor- talidad	Probit
0	99	1	0	3	68	27	0	-
$0,39 \times 10^7$	99	25	25	2	59	13	28,7	4,43
$0,89 \times 10^7$	99	22	22	10	53	14	23,4	4,27
$1,59 \times 10^7$	99	41	40	6	24	28	42,6	4,81
$1,59 \times 10^8$	99	56	56	1	22	20	59,6	5,24
$3,19 \times 10^8$	99	78	78	2	4	15	82,8	5,95

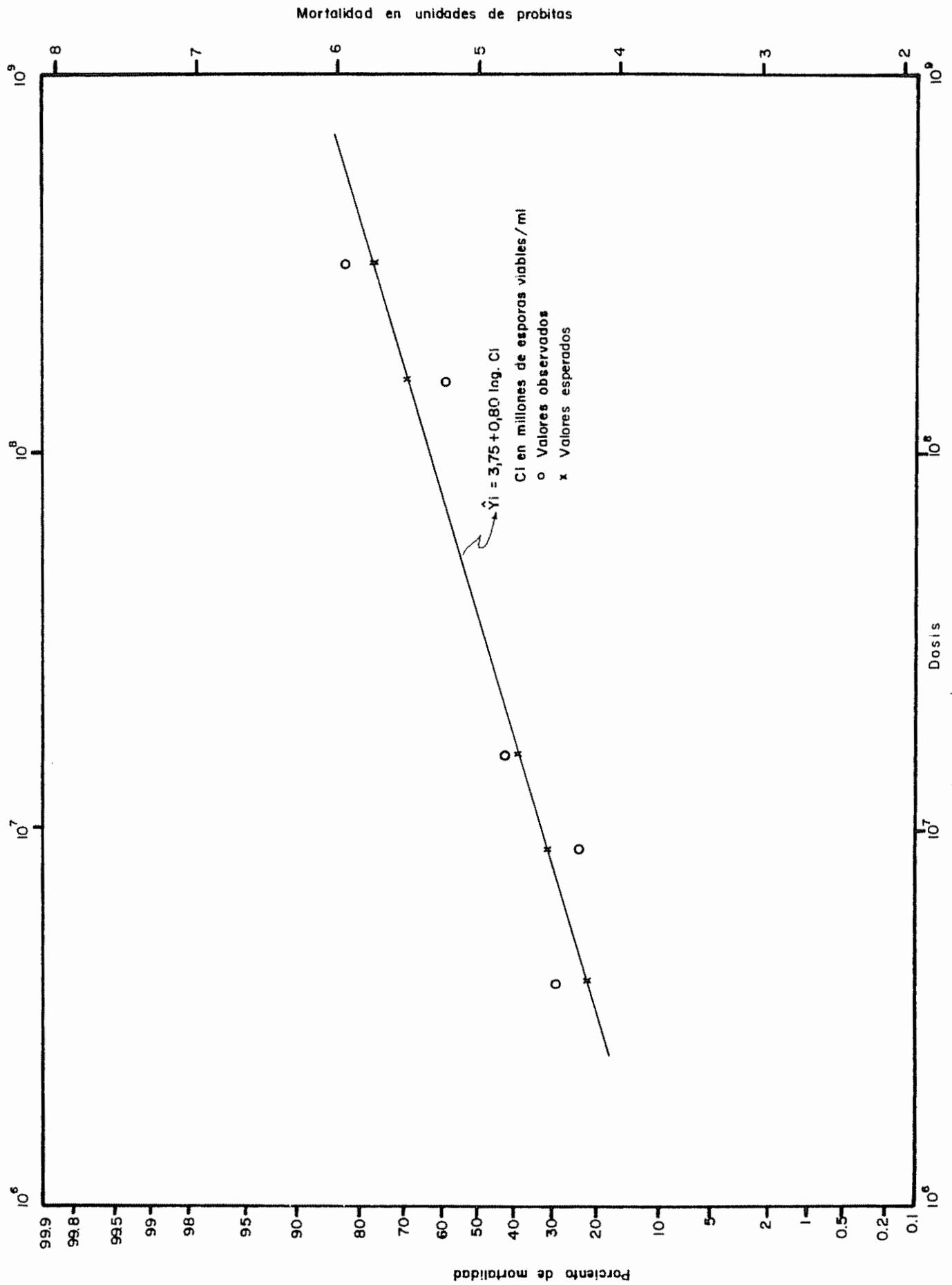


Fig. 13 Línea de regresión calculada para los valores de dosis-mortalidad de *M. anisopliae* sobre *H. grandella*.

viabiles/ml. El límite de confianza de 95% para el valor de la pendiente fue de 0,795 a 0,905.

Las dosis calculadas de esporas viabiles/ml que son requeridas para obtener 25, 50 y 75 por ciento de mortalidad, con límites fiduciales de 95% para cada nivel de mortalidad, son presentados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Número de esporas viabiles/ml de *M. anisopliae* requeridas para producir 25, 50 y 75 por ciento de mortalidad en la V fase de *H. grandella*.

Por ciento de mortalidad	Esporas viabiles/ ml	Límites fiduciales al 95% Superior	Inferior
25	$5,4 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
50	$3,6 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
75	$2,7 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$

4.5 Sobrevivencia de Esporas de *Metarrhizium anisopliae* a la Radiación Ultravioleta

La Figura 14 muestra la reducción en viabilidad, ocasionada por la irradiación; se nota que la variación en susceptibilidad está influenciada por la edad de las esporas.

La curva de sobrevivencia en todos los casos presentan hombros que no sobrepasan un ciclo de inactivación: posteriormente la curva se vuelve lineal en algunos casos y en otros adquiere una nueva tendencia, dependiendo de la edad de las esporas. La presencia de tales hombros demuestra la existencia de mecanismos enzimáticos de reparación del daño, en las esporas del hongo.

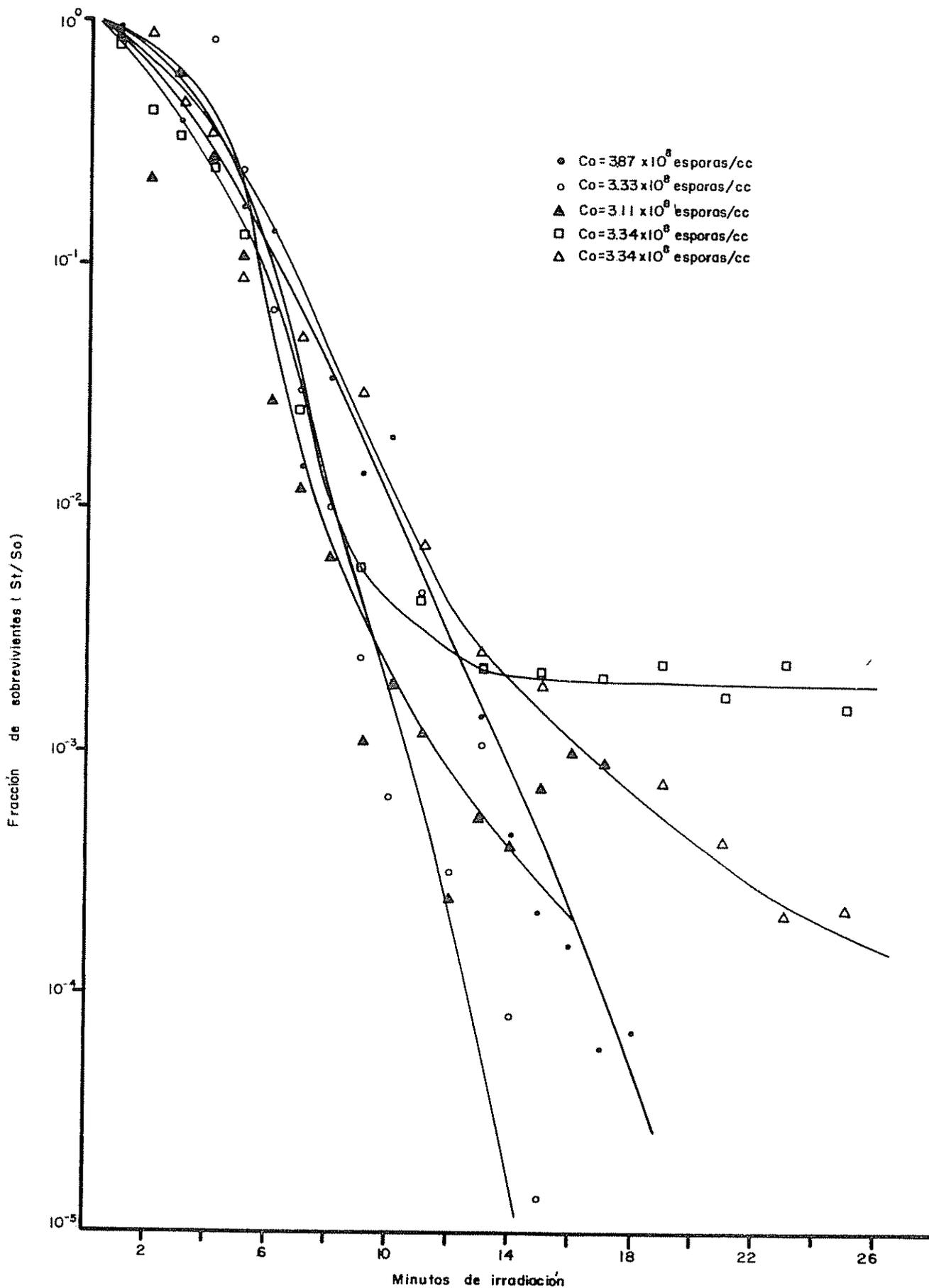


Fig 14 Sobrevivencia relativa de esporas de *M. anisopliae* en suspensión acuosa, después de irradiadas con luz ultravioleta 254 nm ($I_0 = 17.5$ ergios/mm²/seg)

Las pruebas realizadas con esporas de diferentes edades (en Figura 14, o Δ pertenecen a esporas de 35, 37 y 44 días después de la siembra y \square Δ corresponden a esporas de 110 y 116 días después de la siembra) presentaron curvas de respuesta dosis-efecto diferentes. Las esporas jóvenes de 35, 37 y 44 días mostraron curvas bifásicas de inactivación que denotan, a) presencia de enzimas que reparan el daño; hombro de la curva y b) agotamiento de la capacidad de reparar el daño por el excesivo número de lesiones, lo cual se manifiesta en el decaimiento exponencial de la curva. Las esporas viejas de 110 y 116 días después de la siembra presentaron curvas trifásicas de inactivación lo cual indica que en la población original y con el transcurso del tiempo se han diferenciado dos tipos de poblaciones, una sensible y otra resistente a la irradiación ultravioleta.

Esporas de lotes de siembra diferente (en Figura 14, o o Δ pertenecen a diferentes lotes y Δ \square Δ corresponden a esporas provenientes de una misma siembra) presentaron curvas de inactivación aproximadamente iguales en tendencia. Análoga situación se presentó con las curvas de inactivación provenientes de una misma siembra. Lo anterior indica que la edad de las esporas es el factor primordial en la respuesta del hongo a la irradiación ultravioleta.

En todas las pruebas la DL_{50} ocasionada por la radiación ultravioleta sobre las esporas de *M. anisopliae*, estuvo comprendida entre los 2 y 4 minutos de irradiación.

4.6 Sobrevivencia de Esporas de *M. anisopliae* a la Irradiación Gamma

La Figura 15 muestra las curvas de inactivación del hongo *M. anisopliae* al ser expuestas a la irradiación gamma. Todas las curvas exhiben la respuesta de un mismo lote de esporas cuya viabilidad fue seguida a través del tiempo.

Lotes de esporas de diferentes edades (en la Figura 15, \circ o pertenecen a esporas de 30 y 44 días después de la siembra; \blacktriangle \triangle corresponden a esporas de 60 y 77 días después de la siembra y \square \square pertenecen a esporas de 106 y 119 días después de la siembra) presentaron una marcada disminución de su viabilidad a medida que transcurría el tiempo.

De acuerdo a la edad de las esporas, se puede identificar dos tipos de respuesta, a) esporas recién cosechadas, 30 a 44 días después de sembradas, muestran un decaimiento suave de la viabilidad con dosis incrementadas de radiación. Dicha respuesta podría atribuirse a la presencia de mecanismos enzimáticos de reparación de las lesiones ocasionadas por la irradiación gamma. Y b) esporas de edades mayores que un mes después de cosechadas, mostraron simples curvas de sobrevivencia o curvas monofásicas, que indican un decaimiento exponencial de la sobrevivencia a medida que se incrementan las dosis de irradiación. La tasa de decaimiento exponencial incrementa con la edad de las esporas.

Estos experimentos indican que la edad de las esporas es un factor en la respuesta del hongo a la irradiación gamma.

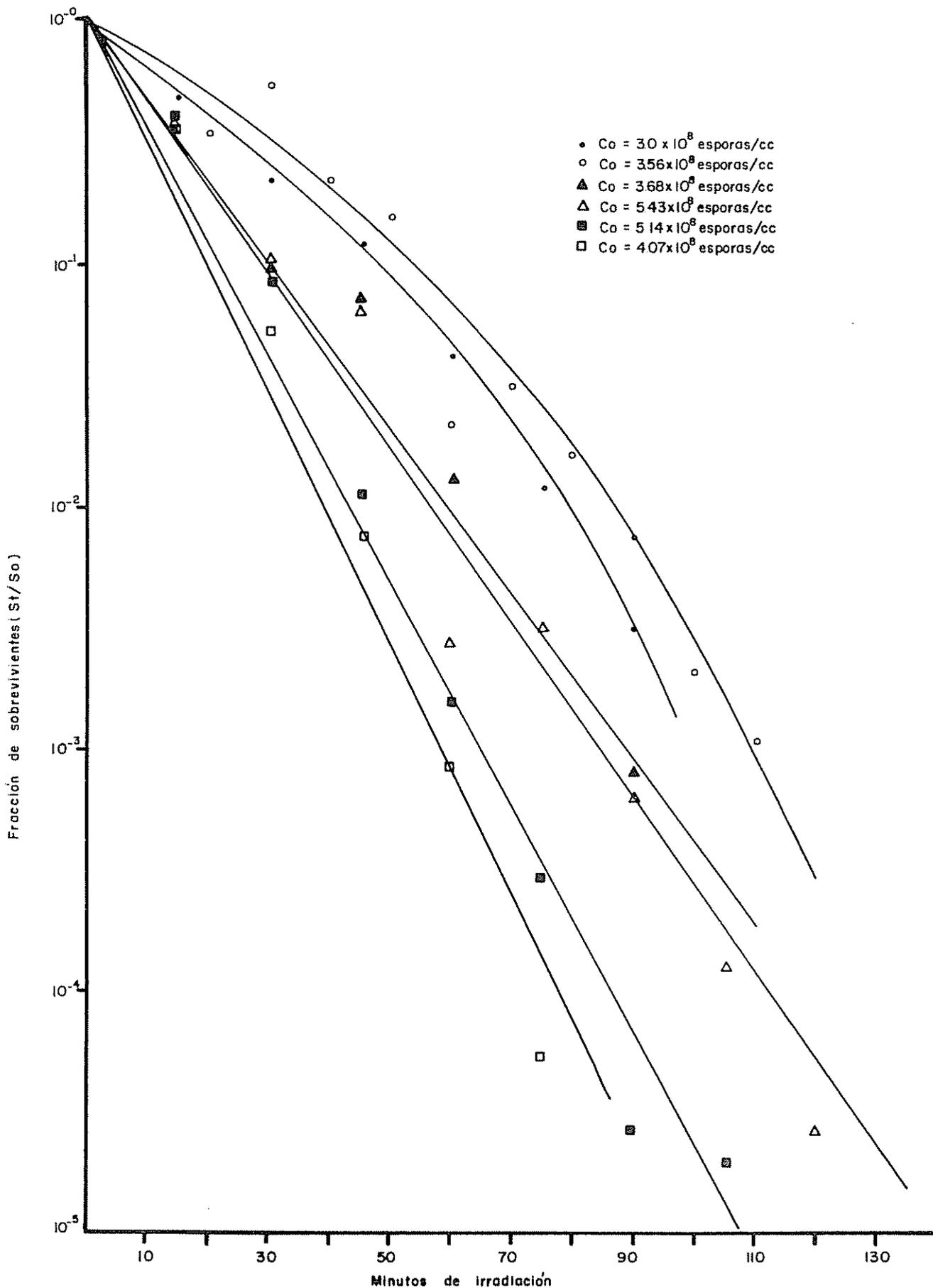


Fig. 15 Sobrevivencia relativa de esporas de *M. anisopliae* en suspensión acuosa, después de irradiadas con rayos gamma ($I_0 = 1,4$ kr/mín.)

La DL_{50} ocasionada por las radiaciones gamma sobre las esporas de *M. anisopliae* dependió directamente de la edad de las esporas, disminuyendo la cantidad de radiaciones necesarias para matar 50% de las esporas a medida que aumentaba la edad de las mismas. El tiempo requerido para inactivar 50% de esporas jóvenes de 30 y 44 días después de la siembra fue de 16 y 20 minutos respectivamente; esporas de 66 y 77 días después de siembra requirieron nueve minutos para ser inactivadas en un 50%; esporas de 106 y 119 días después de sembradas requirieron solamente seis minutos de irradiación para ser inactivadas en un 50%.

4.7 Obtención de Mutantes de *M. anisopliae* mediante el Uso de Rayos Gamma

Los experimentos de determinación de sobrevivencia, fueron utilizados para detectar la presencia de mutantes de color, para ello se sembraban platos con la suspensión irradiada con la dosis máxima, sin diluir, colocando 0,1 cc de suspensión irradiada por plato. Dichos platos fueron puestos a incubar en una estufa a 30°C y dejados por un tiempo, hasta esporulación.

Mutantes de diferente coloración fueron obtenidos después de irradiar la suspensión acuosa de esporas, con una intensidad de 168 kr, en exposiciones fraccionadas de 15 minutos o sea 21 kr por vez.

En total se diferenciaron 13 mutantes de los cuales solamente cuatro fueron purificados. Los colores obtenidos fueron amarillo café, café rojizo, plateado y blanco. Se observó que dichos hongos al ser cultivados agotaban rápidamente el medio, debido,

probablemente a una gran actividad enzimática. Otra característica presentada por los mutantes es la extrema dificultad para despegar las esporas del medio en que se encuentran creciendo.

Prueba inicial de patogenicidad de uno de los mutantes, sobre una mezcla de las últimas fases de *H. grandella* mostró que el hongo conserva sus propiedades patogénicas. La recuperación del hongo de larvas muertas, indica que la característica de coloración ha quedado fijada genéticamente.

5. DISCUSION

En los resultados de la prueba preliminar de patogenicidad, la presencia del hongo *M. anisopliae* atacando las larvas de *H. grandella*, fue manifiesta. Los síntomas exhibidos por las larvas atacadas son similares a los descritos por Getzin y Shanks (24) para el sinfílido *Scutigerebella immaculata*, y a los descritos por Steinhaus (54) para varias especies de insectos.

La observación de un máximo de mortalidad, en el experimento preliminar de patogenicidad, de seis días sirvió para utilizar dicha fecha como tiempo indicativo en posteriores evaluaciones. Los períodos de máxima mortalidad encontrados en el presente estudio coinciden con los observados por Getzin y Shanks (24) en sus trabajos con sinfílicos.

La mayoría de larvas de *H. grandella* atraviesa seis fases y otra gran parte siete fases y una pequeña fracción solamente cinco fases. Ramírez (45) en su investigación preliminar sobre biología, ecología y control de *H. grandella* anota solamente seis fases, sin embargo se refiere a la posibilidad de existencia de larvas que atraviesan más o menos mudas.

Los períodos medios para pupación y emergencia, ocurrieron a los 30 y 40 días después de la eclosión; estos resultados difieren parcialmente a los encontrados por Grijpma (27) en dieta artificial y condiciones de laboratorio y a los observados por Ramírez (45). Una posible explicación de tal respuesta podría ser las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el experimento.

La crianza del insecto fue efectuada en cámaras húmedas con el objeto de que la dieta artificial no perdiera humedad. Sin embargo, el período pupal coincide con los datos encontrados por Grijpma (27) y Ramírez (45).

El tamaño promedio alcanzado por las larvas, coincide con los valores anotados por Grijpma (27) y Ramírez (45), no siendo así para los valores de tamaños de cuerpo alcanzado a los tiempos de ecdisis, encontrados por Ramírez (45). En estos experimentos no se hizo distinción entre sexos.

Una relación relativamente constante entre los anchos y los largos de cápsulas cefálicas de las diferentes fases a partir de la segunda fue evidente. Estos resultados son similares a los señalados por Richards (47) para varios géneros de insectos. Esta constancia hace razonable la suposición de que la tasa de incremento por día es constante y que se podría sugerir la existencia de un período inicial durante el cual el crecimiento es casi nulo. La línea recta trazada entre los valores experimentales de los largos de cápsulas cefálicas tiene un mejor ajuste, que la trazada entre los valores observados de los anchos de cápsulas cefálicas.

La determinación de la fase más susceptible se realizó con el objeto de uniformizar al huésped para futuras pruebas biológicas.

Las primeras fases de *Hypsipyla* fueron más resistentes al hongo que las últimas. Las fases I y II prácticamente no son atacadas; las fases III y IV a pesar de ser más susceptibles que las dos primeras, son más resistentes que las dos últimas V, VI y VII, las

cuales presentan la mayor susceptibilidad al hongo. Estos resultados están en consonancia con la regla de que a mayor edad mayor susceptibilidad (35). La susceptibilidad de las últimas fases y en especial de la V ha sido demostrada por diversos experimentos con varios tipos de patógenos además de hongos. Miyajima y Kawase (41) realizaron estudios de infectividad con virus, utilizando en dichas pruebas la V fase del gusano de seda. Morris (43) llevó a cabo investigaciones para comprobar el efecto de la luz solar, radiación ultravioleta, radiación gamma y temperatura sobre la capacidad de infección del virus polihédrico, utilizando como insecto prueba la V fase de *Lambdina fiscellaria lugubrosa*.

La V fase fue utilizada en la determinación de la DL_{50} . La determinación de la DL_{50} constituye la mejor medida cuantitativa de la patogenicidad de un organismo sobre un huésped.

Los valores de la DL_{50} sobre la V fase oscilan entre $2,3 \times 10^7$ y $7,6 \times 10^7$ esporas viables/ml con un límite de confianza del 95%; el límite inferior de este intervalo se encuentra cerca de la dosis obtenida en la prueba preliminar de patogenicidad $1,7 \times 10^7$ esporas viables/ml, con la cual se obtuvo el 50% de mortalidad. Se podría pensar que esta pequeña diferencia sea debida a que en la prueba preliminar de patogenicidad las larvas fueron escogidas por edad, edades que comprendían larvas en su mayoría de la V fase y algunas de la IV, las cuales introdujeron la variación.

La mayoría de pruebas biológicas han sido conducidas con bacterias y virus, no habiéndose encontrado pruebas biológicas que hayan sido realizadas con hongos. Sin embargo, las condiciones

generales bajo las cuales el ensayo es conducido, preparación pura del patógeno, insecto prueba uniforme y la uniformización de las condiciones del ensayo son válidas para este tipo de prueba y han sido cumplidas en el presente experimento. La temperatura y la humedad no se controlaron por falta de equipo adecuado.

La patogenicidad del hongo sobre las últimas fases, hace pensar en la poca eficacia de *M. anisopliae* sobre el insecto *H. grandella* debido a los hábitos de vida del barrenador, el cual permanece dentro de la planta huésped durante las últimas fases. Sin embargo, el uso de *M. anisopliac* no debe ser descartado, ya que es posible con el uso de agentes mutagénicos lograr un aumento de la patogenicidad del hongo y en el mejor de los casos, patogenicidad en las primeras fases.

Las curvas de sobrevivencia fueron determinadas para obtener una indicación de la sensibilidad de las esporas de *M. anisopliae* a las irradiaciones gamma. En todos los casos la sobrevivencia de las conidias fue reducida por la irradiación gamma. La sobrevivencia de las conidias irradiadas varió según la edad de las esporas, siendo mayor en esporas jóvenes y menor en esporas viejas; la diferencia se hacía mayor cuando la dosis de radiación era incrementada.

Resultados similares han sido obtenidos por Chou y asociados (11), en sus trabajos sobre el efecto de la radiación gamma sobre *Penicillium expansum* L. y por Malla y colaboradores (40) al estudiar la susceptibilidad de cepas de *Penicillium viridicatum* y *Aspergillus flavus* a la irradiación beta.

Las diferencias de susceptibilidad entre conidias jóvenes de 1 a 2 semanas y conidias de 6 meses de edad, del hongo *Penicillium expansum* fueron relativamente pequeñas; la DL_{90} para esporas de *Penicillium* de 1 a 2 semanas fue de 70 kr en tanto esporas de seis meses presentaron una DL_{90} de 50 kr. Sin embargo, esporas de *M. anisopliae* de 30 días presentaron una DL_{90} de 70 kr y esporas de 120 días presentaron una DL_{90} de 28 kr. La coincidencia en los valores de DL_{90} para esporas jóvenes, hace pensar en que la respuesta de ambos hongos a la irradiación gamma es similar, aún cuando la respuesta de *Penicillium* muestra una curva bifásica de inactivación. El aumento en susceptibilidad de *M. anisopliae* es debido a que el almacenaje de las esporas no fue a bajas temperaturas, sino a temperatura ambiente.

Al igual que con la irradiación gamma, curvas de sobrevivencia de esporas de *M. anisopliae* a la irradiación ultravioleta fueron obtenidas. La sobrevivencia de esporas jóvenes a la irradiación ultravioleta fue reducida, presentando curvas bifásicas de inactivación. La sobrevivencia de esporas mayores de dos meses de cosechadas, mostraron curvas trifásicas de inactivación, no pudiendo explicarse el porqué de tal respuesta. Trabajos de determinación de sobrevivencia a irradiación ultravioleta en hongos han sido realizados por Hollander y colaboradores (32) sobre el hongo *Neurospora crassa* en sus estudios acerca del efecto de diferentes longitudes de onda y su dependencia con la capacidad de mutación del hongo.

Mutantes de coloración diferentes fueron obtenidos por la irradiación gamma. Resultados similares han sido obtenidos por

Sansome y colaboradores (50) con el hongo *Neurospora crassa*, los cuales han también obtenido mutantes de diferente coloración. La característica observada en dicha investigación de reversión de mutantes a la forma original después de varios subcultivos, fue observada en el presente estudio.

La patogenicidad de uno de los mutantes sobre larvas de *H. grandella* fue constatada. Tal resultado brinda la posibilidad de futuros estudios, que podrían culminar con la determinación de patógenos de primeras fases de *Hypsipyla grandella* Zeller.

6. CONCLUSIONES

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

- 1- La patogenicidad del hongo está directamente relacionada con la concentración de esporas
- 2- La virulencia del hongo no fue afectada por el número de generaciones que el hongo fue cultivado en medios artificiales
- 3- La sobrevivencia del hongo *M. anisopliae* a la irradiación ultravioleta fue determinada, encontrándose dos tipos de curvas de dosis de radiación-efecto, a) curvas bifásicas las que indican la existencia de mecanismos enzimáticos de reparación de las lesiones causadas por la irradiación y b) curvas trifásicas que indican la diferenciación de dos tipos de poblaciones; estas curvas trifásicas se presentaron con esporas de más de dos meses después de sembradas.
- 4- La sobrevivencia del hongo *M. anisopliae* a la irradiación gamma fue determinada encontrándose dos tipos de respuesta a) esporas jóvenes, un mes después de sembradas, mostraron curvas de dosis de radiación-efecto indicativas de la presencia de mecanismos de reparación y b) esporas viejas, dos meses después de sembradas en adelante, mostraron curvas de sobrevivencia que decaían exponencialmente.
- 5- Mutantes de colores, amarillo café, café rojizo, plateado y blanco, del hongo *M. anisopliae* fueron obtenidos después de una irradiación gamma de 198 kr.

- 6- Prueba de patogenicidad del mutante, amarillo café, sobre una mezcla de larvas entre IV y V fase mostró la patogenicidad de dicho mutante, habiéndose recuperado el color del mutante en larvas muertas por el hongo.

Se recomienda:

- 1- Realizar un estudio exhaustivo del ciclo de vida del insecto, aumentando el número de observaciones.
- 2- Estudiar la posibilidad de producir el patógeno masivamente, para realizar pruebas de campo.
- 3- Determinar la sobrevivencia de *M. anisopliae* a la luz solar a fin de determinar la persistencia del patógeno en el campo.
- 4- Probar todos los mutantes y estudiar la patogenicidad de los mismos para las primeras fases.

7. RESUMEN

El barrenador de las Meliáceas *Hypsipyla* spp. constituye el factor limitante para el desarrollo normal de plantaciones de cedros, caobas y otras especies de plantas en áreas tropicales y subtropicales de Asia, Africa y América.

El daño ocasionado por este barrenador consisten en la destrucción de meristemas terminales de árboles jóvenes, causando ramificaciones indeseables. Las experiencias con infestaciones de *Hypsipyla* han sido desastrosas en países tales como Puerto Rico, Perú, Trinidad, India, en los cuales plantaciones enteras han tenido que ser abandonadas.

El control de *Hypsipyla* spp. presenta algunos problemas como son, desconocimiento de algunos aspectos fundamentales de la biología y taxonomía del insecto, dificultad de su control con insecticidas químicos por el alto costo, y por la ineficacia del poder residual bajo condiciones de alta pluviosidad. Tal circunstancia hace pensar en la importancia de lograr medidas adecuadas y eficaces de controlar a *Hypsipyla*.

La presente investigación tuvo por finalidad a) averiguar el posible uso de *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) como insecticida biológico en el control de *Hypsipyla grandella* Zeller; b) tratar de aumentar la patogenicidad, del hongo sobre el insecto, mediante el uso de irradiación gamma y ultravioleta.

Para lograr tales objetivos se determinó: susceptibilidad de *H. grandella* al hongo *M. anisopliae*, número de fases, la fase más

susceptible a *M. anisopliae*, dosis-letal-50 (DL_{50}) del hongo sobre el insecto, sobrevivencia del hongo a la irradiación gamma y ultravioleta y prueba preliminar de mutantes.

Pruebas preliminares de patogenicidad indicaron la susceptibilidad del barrenador al hongo *M. anisopliae*.

La determinación del número de fases indicó que *H. grandella*, bajo las condiciones del experimento, atraviesa seis fases habiéndose observado larvas que pasaban por siete fases y otras solamente por cinco fases.

La V fase de *H. grandella* resultó ser la más susceptible a *M. anisopliae*.

La dosis letal-50, determinada sobre la fase más susceptible, fue de $3,6 \times 10^7$ esporas viables por ml, con límites de confianza al 95% de $2,3 \times 10^7$ y $7,6 \times 10^7$ esporas viables por ml.

Con el objeto de determinar la susceptibilidad de esporas del hongo a la irradiación ultravioleta, se determinaron curvas de dosis de radiación-efecto. Estas presentaron dos tipos de tendencia: a) esporas jóvenes, de un mes después de sembradas, mostraron curvas bifásicas de inactivación, las que indican la presencia de mecanismos enzimáticos de reparación de las lesiones producidas por la irradiación y b) esporas viejas, de más de tres meses después de sembradas, mostraron curvas trifásicas de inactivación, lo cual indica que en la población original se han diferenciado esporas resistentes y susceptibles a las radiaciones.

La susceptibilidad del hongo a la irradiación gamma fue determinada. Dos tipos de respuesta fueron obtenidas a) la sobrevivencia

de esporas jóvenes, de un mes después de sembradas, decayó suavemente a medida que las dosis de radiación se incrementaban y b) la sobrevivencia de esporas viejas, de más de dos meses después de sembradas decayó exponencialmente, con dosis incrementadas de radiación; se encontró una relación directa entre edad de las esporas y susceptibilidad de las mismas a la irradiación.

Mutantes de colores, amarillo café, café rojizo, plateado y blanco fueron obtenidos después de irradiar una suspensión de esporas con 198 kr, en exposiciones fraccionadas.

Prueba de patogenicidad de uno de los mutantes, amarillo café, sobre una mezcla de larvas de IV y V fase, mostró la patogenicidad de dicho mutante, habiéndose recuperado el color del mutante en larvas muertas por el hongo.

7a. SUMMARY

The shootborer of the Meliaceae is the limiting factor in the successful establishment of high-value timber plantations in tropical and subtropical areas of Asia, Africa and America.

The damage caused by this borer consists of the destruction of the growing shoots of young trees, causing undesirable form of the trees. The experience with *Hypsipyla* infestation has been disastrous for countries such as Puerto Rico, Peru, Trinidad, India, where entire plantations have had to be abandoned.

It is difficult to control the *Hypsipyla* as basic information on the biology and behavior of the insect is still lacking. Control of this insect by means of insecticides is not considered feasible as insecticides are costly, and have poor residual power under tropical conditions. This brings about the importance of being able to obtain adequate and effective means of controlling *Hypsipyla*.

The present research was carried out to: a) find out the possible use of *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) as a biological insecticide in the control of *Hypsipyla grandella* Zeller; b) try to increase pathogenicity of the fungus over the insect, through the use of gamma and ultraviolet irradiations.

In order to achieve these objectives, the following were determined: susceptibility of *H. grandella* to the fungus *M. anisopliae*; number of instars; the instar most susceptible to *M. anisopliae*; LD₅₀ of the fungus over the insect; and survival of the fungus to gamma and ultraviolet irradiation.

The preliminary pathogenicity tests showed the susceptibility of the shootborer to the fungus *M. anisopliae*.

The determination of the number of instars indicated that *H. grandella*, under laboratory conditions, has six instars, with some larvae having 5 or 7 instars.

The LD₅₀ determined over the most susceptible instar was a concentration of 3.6×10^7 viable spores per ml, with 95% confidence limit of 2.3×10^7 and 7.6×10^7 viable spores/ml.

In order to determine the sensitivity of the spores of the fungus to ultraviolet radiation curves of the radiation-effect dose were determined. These present two types of tendency: a) young spores, one month after being sown, showing diphasic inactivation curves, which indicate the presence of enzymatic repair mechanisms for the lesions produced by the radiation and b) old spores, over three months after being sown, showing triphasic inactivation curves, which indicate a differentiation of the original population in radiation-resistant and -susceptible spores.

The survival of the fungus under gamma irradiation was determined. Two types of response were obtained: a) the survival of young spores, one month after being sown, decreased gradually with the increase of radiation dose and b) the survival of old spores, over two months after being sown, decreased exponentially, with increased radiation doses, old spores, being more radiation sensitive than young spores.

Brownish yellow, reddish brown, silver and white color mutants were obtained after irradiating a concentration of spores with 198 kr

in 15-minute fractioned exposures.

Pathogenicity test of the brownish yellow mutant in a mixed larval population of IV and V instars, showed the pathogenicity of said mutant.

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. ALEXOPOLUS, C. J. The fungi. In _____ ' Introductory mycology. New York, Wiley, 1962. pp. 31-36.
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 *Cedreia odorata* L. *Turrialba* 20(4):478-487. 1970.
4. BACH, P. DE. El alcance del control biológico. In _____. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Traducción de C. M. Castaños. México, D. F., Continental, 1968. pp. 31-48.
5. BELL, J. V. y HAMALLE, R. J. Three fungi tested for control of the cowpea curculia, *Chalcodermus aeneus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17(2):256-259. 1971.
6. BOLETIN INFORMATIVO del grupo de trabajo sobre *Hypsipyla*. IICA. Turrialba, Costa Rica, 1970. 4 p.
7. BROOKS, D. L. y RAUN, E. S. Entomogenous fungi from corn insects in Iowa. *Journal of Invertebrate Pathology* 7(1): 74-81. 1965.
8. BÜNZLY, G. H. y BÜTTIKER, W. W. Fungus diseases of lamellicorn larvae in Southern Rhodesia. *Bulletin of Entomological Research* 50(1):89-96. 1959.
9. BURGOS, J. A. Un estudio de la silvicultura de algunas especies forestales en Tingo María, Perú. *Caribbean Forester* 15(1-2):14-53. 1954.
10. CATER, J. C. The silviculture of *Cedreia mexicana*. *Caribbean Forester* 6(3):89-113. 1945.
11. CHOU, 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.
12. 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.

13. DE ARMON, I. A. y LINCOLN, R. E. Number of animals required in the bio-assay of pathogens. *Journal of Bacteriology* 78(5):651-657. 1959.
14. DESROSIER, N. W. y ROSENSTOCK, H. M. Radiation effects on single cells. In _____ . Radiation technology in food agriculture and biology. Connecticut, Avi Publishing, 1960. pp. 221-223.
15. DOUROJEANNI, R. M. El barrenamiento de los brotes (*Hypsipyra grandella*) en cedro y caoba. *Agronomía (Perú)* 30(1):35-43. 1963.
16. DROOZ, A. T. Elm spanworm head capsule widths and instar. *Journal of Economic Entomology* 58(4):629-631. 1965.
17. DYAR, H. G. The number of moults in Lepidopterous larvae. *Psyche* 5:175-176, 420-422. 1890.
18. ENTWISTLE, P. F. The current situation on shoot, fruit, and collar borers of the meliaceae. Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford, England, 9th British Commonwealth Forestry Conference, 1968. 15 p.
19. FAO STAFF, Shootborers of the Meliaceae. *Unasyuva* 12(1):30-31. 1958.
20. FINNEY, D. J. Statistical method in biological assay. New York, Hafner, 1952. 469 p.
21. FISHER, R. y YATES, F. Tablas estadísticas. Traducido por J. Ruiz Magan y J. Ruiz Rubio, 3era ed. Madrid, Aguilar, 1949. 131 p.
22. FOX, C. J. The incidence of green muscardine in the European wireworm *Agriotes obscurus* (Linn.) in Nova Scotia. *Journal of Insect Pathology* 3(1):94-95. 1961.
23. GETZIN, L. W. *Spicaria rileyi* (Farlow) an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). *Journal of Insect Pathology* 3(1):2-10. 1961.
24. _____ y SHANKS, C. H. Infection of the garden symphytan *Scutigera inmaculata* (Newport) by *Entomophthora coronata* (Cons.) Kev. and *M. anisopliae* (Met.) Sor. *Journal of Insect Pathology* 6(3):542-543. 1964.
25. GOULDEN, C. Methods of statistical analysis. 2da. ed. New York, Wiley, 1952. 467 p.

26. GRIJPMA, P. Immunity of *Toona ciliata* M. Roem var *australis* (F v M) CDC and *Khaya ivorensis* A Chev. to attacks of *Hypsipyla grandella* Zeller in Turrialba, Costa Rica. *Turrialba* 20(1):85-93. 1970.
27. _____ . Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* Zeller V. Observations on a rearing technique and a host selection behavior of adults in captivity. *Turrialba* 21(2):202-213. 1971.
28. 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.
29. _____ . El uso de microorganismos en el control biológico. In Bach, P. *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. Traducción por C. M. Castaños. México, D. F., Continental, 1968. pp. 715-737.
30. HEINRICH, C. American moths of the subfamily Phycitinae. *Bulletin of the Smithsonian Institute of Washington, United States National Museum* 207:1-2, 27-30. 1956.
31. HOLDRIDGE, L. R. Comments on the silviculture of *Cedrela*. *Caribbean Forester* 4(2):77-80. 1954.
32. HOLLAENDER, A. *et al.* Quantitative irradiation experiments with *Neurospora crassa*. II. Ultraviolet irradiation. *American Journal of Botany* 32(4):226-235. 1945.
33. 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.
34. KANDASAMY, D. *Hypsipyla robusta* (Moore) a new hostfor *Beauveria tenella* (Delacroix) Siemaszko. *Journal of Invertebrate Pathology* 13(1):149-150. 1969.
35. KILGORE, W. W. *Pest control: biological, physical, and selected chemical methods*. New York, Academic Press, 1967. 474 p.
36. LARVIS, J. L. Studies of *Phyllophaga auxia* (Coleoptera, Scarabaeidae) in the sandhills area of Nebraska. *Journal of the Kansas Entomological Society* 39(3):401-409. 1966.
37. 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.

38. MAC LEOD, D. M. Investigations on the genera *Beauveria bassiana* Vuill and *Trichirachium limber*. Canadian Journal of Botany 32(6):818-893. 1954.
39. MADELIN, M. F. Los hongos endoparasitos de insectos. Endeavour 19(75):181-190. 1960.
40. MALLA, D. S. *et al.* *In vitro* susceptibility of strains of *Penicillium viridicatum* and *Aspergillus flavus* to beta irradiation. Experientia 23:492-495. 1967.
41. MIYAJIMA, S. y KAWASE, S. Changes in virus infectivity titer in the hemolymph and midgut during the course of a cytoplasmic polyhedrosis in the silk worm. Journal of Invertebrate Pathology 12:329-334. 1968.
42. 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.
43. _____. The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations, and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus. Journal of Invertebrate Pathology 18: 292-294. 1971.
44. NIRULA, K. K. Observations on the green muscardine fungus in populations of *Oryctes rhinocerus* L. Journal of Economic Entomology 50(6):767-769.
45. RAMIREZ, J. Investigación preliminar sobre biología, ecología y control de *Hypsipyla grandella* Zeller. Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) 16:5-77. 1964.
46. RAO, V. P. y BENNET, F. D. Possibilities of biological control of the Meliaceae shoot borers *Hypsipyla* spp. (Lepidoptera: Phycitidae). Commonwealth Institute of Biological Control. Technical Bulletin no. 12. 1969. pp. 61-81.
47. RICHARDS, O. W. The relation between measurements of the successive instar of insects. Proceedings of the Royal Entomological Society (A) 24(1):8-10. 1949.
48. 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.
49. RORER, J. B. The use of the green muscardine in the control of sugarcane pest. Phytopathology 3(2):88-92. 1913.

50. SANSOME, E. R., DEMEREC, M. y HOLLAENDER, A. Quantitative irradiation experiments with *Neurospora crassa*. I. Experiments with x-rays. American Journal of Botany 32(4):218-225. 1945.
51. SHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycose caused by the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*. Journal of Insect Pathology 6(1):8-10. 1964.
52. SMITH, E. C. The effects of radiation on fungi. In Duggar, B. M., ed. Biological effect of radiation. New York, McGraw-Hill, 1936. v.2, pp. 889-918.
53. SMITH, K. C. y HANAWALT, P. C. Molecular photobiology. New York, Academic Press, 1969. 230 p.
54. STEINHAUS, E. A. Fungus infections. In _____. Principles of insect pathology. New York, McGraw-Hill, 1949. pp. 318-398.
55. _____. Microbial control. Hilgardia 26(2):107-157. 1956.
56. SWEETMAN, H. L. The principles of biological control. Iowa, Brown, 1958. 560 p.
57. TILLMANS, H. S. Apuntes bibliográficos sobre *Hypsipyla grandella* Zeller. Boletín Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (Venezuela) 14:83-96. 1964.
58. TOUMANOFF, K. The action of various entomopathogenous fungi of *Reticulitermes santimonensis*. Annals Parasital Hum. Comp. 40(5):611-624. 1965. (Original no consultado, compendiado en Biology Abstracts 49(7):37728. 1968).
59. WADLEY, F. M. Experimental statistics in entomology. Washington, D. C. USDA, Graduate School Press, 1967. 133 p.
60. WALSTAD, J. D., ANDERSON, R. F. y STAMBAUGH, W. S. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology 16(2):221-226. 1970.
61. 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)
62. ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *M. anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. Journal of Invertebrate Pathology 15(3):372-396. 1970.
63. _____ 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.

APENDICE

Cuadro 1. Tiempo de duración entre las diferentes ecdisis, hasta emergencia de adultos

No. larva	Eclosión	1a ecd.	2a ecd.	3a ecd.	4a ecd.	5a ecd.	6a ecd.	Pupa	Adultos
1	0	3	8	15	19	27	--	30	--
2	0	3	7	10	13	18	21	29	43
3	0	3	6	10	13	17	26	28	38
4	0	3	7	11	14	17	--	26	--
5	0	3	7	10	13	17	23	30	42
6	0	3	6	9	12	17	20	26	36
7	0	3	7	10	13	17	--	26	31
8	0	3	7	11	16	18	23	29	41
9	0	3	7	10	13	18	--	31	--
10	0	3	7	10	13	17	23	27	38
11	0	3	7	9	12	15	21	31	43
12	0	3	9	12	15	18	23	26	44
13	0	3	7	11	14	18	--	17	38
14	0	3	7	9	12	15	--	26	36
15	0	3	9	17	21	26	--	33	44
16	0	3	7	10	15	18	--	26	36
17	0	3	7	9	12	15	--	23	35
18	0	3	7	9	11	14	--	22	35
19	0	3	6	10	14	16	20	31	43
20	0	3	6	9	12	16	19	30	42
21	0	3	6	9	14	18	--	29	42
22	0	3	7	10	14	17	--	26	42
23	0	3	7	10	14	19	24	32	43
24	0	3	7	11	14	18	--	25	36
25	0	3	6	9	12	16	--	26	36
26	0	3	6	10	14	18	--	25	37
27	0	3	7	10	13	16	19	26	40
28	0	3	6	9	13	17	22	22	--
29	0	3	8	12	19	--	--	33	43
30	0	3	6	10	13	17	00	25	36
31	-	3	6	9	12	17	22	32	--

Cuadro 2. Longitud del cuerpo de larvas de *Hypsipyga grandella* Zeller al tiempo de ecdisis

No. de larva	Ecdosis	1a ecd.	2a ecd.	3a ecd.	4a ecd.	5a ecd.	6a ecd.
-----mm-----							
1	1,6	2,3	4,1	8,2	9,5	10,5	---
2	1,6	2,4	5,1	9,0	10,5	16,0	21,0
3	1,6	2,4	5,0	8,0	10,5	17,0	20,0
4	1,6	2,5	4,1	7,6	11,5	15,0	---
5	1,6	2,4	4,2	5,8	9,1	13,0	20,0
6	1,6	2,4	5,0	9,2	12,0	19,0	22,0
7	1,6	2,4	4,0	7,8	11,4	16,3	---
8	1,6	2,4	3,2	8,2	11,5	13,8	20,0
9	1,6	2,5	5,0	9,0	12,5	18,0	---
10	1,6	2,4	5,0	7,0	11,2	16,5	22,0
11	1,6	2,4	5,2	7,3	10,4	18,5	26,4
12	1,6	2,4	5,0	9,0	12,5	15,5	23,0
13	1,6	2,4	3,5	7,2	9,2	13,5	---
14	1,6	2,4	5,0	6,8	10,3	17,0	---
15	1,6	2,3	3,8	9,1	12,1	16,0	---
16	1,6	2,5	4,2	7,0	12,0	16,0	---
17	1,6	2,5	5,1	7,0	10,0	14,0	---
18	1,6	2,3	4,4	12,0	14,0	20,0	---
19	1,6	2,4	3,8	6,8	15,0	17,0	18,0
20	1,6	2,4	5,0	7,0	10,2	19,0	20,9
21	1,6	2,4	5,0	6,8	8,5	16,0	---
22	1,6	2,4	4,0	9,0	11,0	17,0	---
23	1,6	2,4	4,9	6,2	9,0	13,8	15,0
24	1,6	2,4	5,0	7,5	10,3	15,5	---
25	1,6	2,4	5,1	6,0	11,0	16,0	---
26	1,8	2,3	4,9	8,0	11,2	13,1	---
27	1,8	2,4	7,3	7,5	12,1	13,1	17,0
28	1,6	2,4	5,0	7,0	11,4	16,5	24,0
29	1,6	2,3	4,0	6,1	9,8	---	---
30	1,6	2,3	4,1	6,4	9,3	13,2	---
31	1,6	2,4	4,2	5,0	8,0	12,0	16,0

Cuadro 3. Valores obtenidos, para los valores de los parámetros de curvas de crecimiento de larvas de *Hypsipyra grandella* Zeller

No. de larva	$\hat{\beta}_0$	$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$
1	11.02590	5.83136	0.19406
2	32.41963	15.51141	0.15661
3.	21.31526	14.55765	0.21996
4	29.98033	20.29466	0.17801
5	30.14966	18.73200	0.15683
6	25.87260	15.42760	0.22191
7	24.33653	19.21807	0.21611
8	31.10894	18.64105	0.15196
9	22.46866	16.04919	0.23172
10	26.03534	18.37488	0.20140
11	32.24123	28.33388	0.23326
12	34.13582	21.96552	0.16516
13	25.78101	16.80381	0.16184
14	31.00000	27.03820	0.22720
15	24.95395	16.03316	0.12921
16	31.59611	19.40027	0.16592
17	27.33091	16.57600	0.19007
18	24.27686	38.50966	0.36993
19	19.96178	29.37717	0.30480
20	26.15670	20.27280	0.22977
21	31.12540	16.27555	0.15131
22	41.19876	23.94977	0.16414
23	17.40580	10.36327	0.18076
24	36.69240	19.99229	0.14865
25	29.84186	18.50084	0.19212
26	14.73447	8.95008	0.23799
27	21.45349	9.71149	0.18328
28	35.83260	18.45515	0.16412
29	15.09770	8.67244	0.14621
30	23.84598	14.29207	0.16219
31	20.03356	11.73156	0.17306

Cuadro 4. Largo y ancho de cápsulas cefálicas de *Hypsipyla grandella* Zeller al tiempo de ecdisis

No. de larva	1a. ecdisis		2a. ecdisis		3a. ecdisis		4a. ecdisis		5a. ecdisis		6a. ecdisis	
	ancho	largo										
1	0,266	0,420	0,350	0,924	0,784	1,176	0,952	1,652	1,239	---	---	---
2	0,266	0,462	0,336	0,714	0,602	1,022	0,868	1,593	1,298	2,124	1,770	---
3	0,266	0,490	0,406	0,784	0,700	1,148	0,910	1,882	1,711	2,124	1,829	---
4	0,261	0,420	0,378	0,756	0,700	1,022	0,896	1,770	1,534	---	---	---
5	0,266	0,462	0,392	0,700	0,588	0,952	0,840	1,534	1,180	2,006	1,652	---
6	0,318	0,546	0,420	0,756	0,630	1,162	0,966	1,711	1,357	2,478	2,065	---
7	0,289	0,462	0,420	0,714	0,630	1,064	0,910	1,711	1,534	---	---	---
8	0,289	0,420	0,364	0,644	0,560	0,944	0,840	1,770	1,416	2,065	1,711	---
9	0,289	0,476	0,406	0,840	0,728	1,232	1,022	2,006	1,770	---	---	---
10	0,266	0,476	0,392	0,714	0,686	1,176	0,980	1,770	1,416	2,242	1,888	---
11	0,289	0,490	0,406	0,742	0,700	1,050	0,952	1,770	1,121	2,242	1,770	---
12	0,289	0,476	0,392	0,714	0,672	1,064	0,966	1,829	1,534	2,360	2,006	---
13	0,289	0,448	0,392	0,770	0,630	1,176	0,980	1,711	1,534	---	---	---
14	0,266	0,434	0,378	0,756	0,616	1,022	0,938	1,825	1,534	---	---	---
15	0,289	0,448	0,378	0,952	0,840	1,162	1,064	2,065	1,652	---	---	---
16	0,289	0,434	0,392	0,826	0,672	1,120	0,910	1,889	1,473	---	---	---
17	0,289	0,420	0,392	0,784	0,658	1,134	0,938	1,711	1,239	---	---	---
18	0,266	0,420	0,392	0,728	0,644	1,176	1,106	1,829	1,475	---	---	---
19	0,266	0,420	0,364	0,644	0,532	0,994	0,882	1,770	1,416	2,183	1,829	---
20	0,266	0,434	0,350	0,644	0,588	0,854	0,770	1,593	1,367	2,360	2,065	---
21	0,266	0,490	0,434	0,770	0,616	0,896	0,812	1,593	1,357	---	---	---
22	0,266	0,420	0,350	0,602	0,532	1,078	0,980	2,124	1,770	---	---	---
23	0,289	0,434	0,294	0,672	0,504	0,840	0,756	1,593	1,416	2,006	1,652	---
24	0,266	0,448	0,378	0,658	0,588	0,994	0,840	1,534	1,416	---	---	---
25	0,289	0,448	0,392	0,700	0,630	0,966	0,868	1,593	1,298	---	---	---
26	0,289	0,406	0,364	0,728	0,588	1,092	0,966	1,770	1,475	---	---	---
27	0,294	0,392	0,350	0,672	0,588	0,868	0,770	1,534	1,298	2,183	1,711	---
28	0,266	0,448	0,322	0,728	0,630	1,120	0,980	1,711	1,534	2,124	1,711	---
29	0,266	0,392	0,322	0,644	0,532	1,246	1,106	---	---	---	---	---
30	0,261	0,420	0,350	0,672	0,574	1,064	0,882	1,652	1,298	---	---	---
31	0,289	0,434	0,364	0,672	0,546	0,952	0,760	1,357	1,121	2,006	1,652	---

Cuadro 5. Mortalidad de larvas de *Hypsipyla grandella* en la I fase atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables/ml. La mortalidad causada por el hongo, calculada usando la fórmula de Abbott, fue de 0,0%

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	6	0	0	0	3
9	8	0	0	0	1
9	6	0	1	0	2
9	5	0	1	0	3
9	7	0	0	0	2
9	6	0	1	0	2
9	6	0	0	0	3
Total	63	44	0	3	16
tratadas					
9	6	0	0	0	3
9	6	0	1	0	2
9	6	0	0	0	3
9	6	0	0	0	3
9	5	0	0	0	4
9	4	0	2	0	3
9	6	0	1	0	2
total	63	39	0	4	20

*Naturalmente, se refiere a la mortalidad no debida al hongo.

Cuadro 6. Mortalidad de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller en II fase, atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables/ml. La mortalidad causada por el hongo, calculada usando la fórmula de Abbott, fue de 0,0%

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	6	0	2	0	1
9	5	1	0	0	3
9	6	0	0	0	3
9	6	1	0	0	2
9	7	1	0	0	1
9	4	1	0	0	4
9	7	0	0	0	2
Total 63	41	4	2	0	16
tratadas					
9	4	0	0	0	5
9	5	0	0	0	4
9	7	0	0	0	2
9	6	0	0	0	3
9	6	0	0	0	3
9	6	0	0	0	3
9	7	0	0	0	2
Total 63	41	0	0	0	22

* Naturalmente, se refiere a la mortalidad no debida al hongo.

Cuadro 7. Mortalidad de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller en III fase, atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables/ml. La mortalidad causada por el hongo, calculada usando la fórmula de Abbott fue de 5,3%.

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	3	5	0	0	1
9	2	7	0	0	0
9	0	7	0	0	2
9	1	7	0	0	1
9	7	2	0	0	0
9	1	7	0	0	1
9	3	5	0	0	1
Total 63	17	40	0	0	6
tratadas					
9	3	3	0	0	3
9	4	3	0	0	2
9	4	2	1	1	1
9	4	3	1	0	1
9	3	3	0	0	3
9	4	2	0	1	2
9	3	2	0	1	3
Total 63	25	18	2	3	15

* Naturalmente, se refiere a la mortalidad no debida al hongo.

Cuadro 8. Mortalidad de larvas de *Hypsipyga grandella* Zeller en IV fase, atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables /ml. La mortalidad causada por el hongo, calculada usando la fórmula de Abbott, fue de 7,0%

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	2	7	0	0	0
9	1	5	0	0	3
9	1	3	0	0	0
9	3	5	0	0	1
9	5	4	0	0	0
9	2	6	0	0	1
9	1	7	0	0	1
Total 63	15	42	0	0	6
tratadas					
9	2	6	0	1	0
9	1	5	1	0	2
9	1	6	0	2	0
9	3	5	0	0	1
9	2	4	0	0	3
9	3	5	0	1	0
9	2	6	0	0	1
Total 63	14	37	1	4	7

* Naturalmente, se refiere a la mortalidad no debida al hongo

Cuadro 9. Mortalidad de larvas de *Hypsipyga grandella* Zeller en V fase, atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables/ml. La mortalidad causada por el hongo, calculada usando la fórmula de Abbott, fue de 32,1%.

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	0	9	0	0	0
9	3	6	0	0	0
9	5	3	0	0	1
9	8	0	0	0	1
9	7	0	0	0	2
9	7	0	0	0	2
9	1	7	0	0	1
Total 63	31	25	0	0	7
tratadas					
9	1	4	0	3	1
9	1	4	0	2	2
9	0	7	0	2	0
9	0	6	0	3	0
9	0	5	0	4	0
9	0	7	0	1	1
9	0	5	0	3	1
Total 63	2	38	0	18	5

* Naturalmente, se refiere a mortalidad no debida al hongo.

Cuadro 10. Mortalidad de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller en VI y VII fases, atacadas por el hongo *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) a una concentración de $9,2 \times 10^7$ esporas viables/ml. La mortalidad causada por el hongo calculada usando la fórmula de Abbott, fue de 18,0%

No. de larvas	Larvas vivas encontradas al fin del experimento	Pupas encontradas	Larvas muertas naturalmente*	Larvas muertas por el hongo	Larvas perdidas
testigo					
9	0	8	0	0	1
9	0	9	0	0	0
9	3	5	0	0	1
9	5	4	0	0	0
9	0	9	0	0	0
9	2	7	0	0	0
9	0	9	0	0	0
Total 63	10	51	0	0	2
tratadas					
9	0	5	1	2	1
9	0	6	0	3	0
9	0	4	0	2	3
9	0	6	0	2	1
9	0	7	1	0	1
9	0	7	0	1	1
9	0	7	0	1	1
Total 63	0	42	2	11	8

* Naturalmente, se refiere a mortalidad no debida al hongo.