

# Hoja TECNICA

No. 39

**CATIE**



## Un nuevo método para la cría masiva de *Hypsipyla grandella*

Carlos Vargas<sup>1</sup>  
Philip J. Shannon<sup>2</sup>  
Rosina Taveras<sup>3</sup>  
Francisco Soto<sup>4</sup>  
Luko Hilje<sup>4</sup>

### Introducción

*Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) es quizás la principal plaga forestal en América Latina y el Caribe, y ataca a varias especies de la familia Meliaceae, entre las que figuran maderas preciosas, como caobas (*Swietenia* spp.) y cedros (*Cedrela* spp.). Su principal daño consiste en la perforación de los brotes nuevos, especialmente el brote terminal, el cual se deforma o ramifica, reduciendo de esta forma el valor comercial del árbol afectado, lo cual ha impedido el establecimiento de plantaciones comerciales en gran escala.

Su gran importancia ha originado amplias iniciativas de investigación, como lo fue el proyecto del *Grupo de Trabajo Interamericano sobre Hypsipyla grandella*, en el CATIE, en el decenio de los 70. Para efectuar muchas de las investigaciones de dicho Grupo, en cuanto a la biología y ecología de dicha plaga, fue necesario desarrollar protocolos para su cría masiva (Grijpma 1973), incluyendo el desarrollo de una dieta artificial (Hidalgo-Salvatierra y Berríos 1973). Sin embargo, hoy se reconoce que existen mejores métodos para lograr esto, uno de los cuales se describe aquí.

### Procedimientos

**Material biológico.** Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Entomología del CATIE, en Turrialba, Costa Rica, y consistieron en múltiples pruebas de combinaciones y proporciones de ingredientes en la dieta,

así como de métodos para favorecer la reproducción y sobrevivencia de los diferentes estadios de *H. grandella*. El material inicial se recolectó en árboles de caoba y cedro, plantados en los predios del CATIE. Este está ubicado a 590 msnm, en la zona de bosque húmedo premontano, donde los valores anuales promedio de las variables climáticas son 22°C, 2479 mm y 87% HR.

**Dieta.** La dieta para criar las larvas consiste en 13 ingredientes (Cuadro 1), la mayoría de los cuales son comunes en las dietas para otros lepidópteros (Hidalgo-Salvatierra 1973a) y se emplearon en una dieta previa utilizada para *H. grandella* (Hidalgo-Salvatierra y Berríos 1973). Los ingredientes más especializados se pueden adquirir en casas comerciales pertinentes, como ICN Biomedicals Inc. (Irvine, California) y BIO-SERV (Frenchtown, New Jersey).

Para su preparación, una vez pesados, los ingredientes secos se deben mezclar bien, excepto la clorotetraciclina (antibiótico) y las vitaminas. Posteriormente se agrega el agua y se agita la mezcla. Esta se coloca en un frasco ("beaker") tapado con un trozo de papel de aluminio, dentro de una autoclave, para ser esterilizada a 121°C y 12 bares de presión, por 20 min, después de lo cual se saca y se homogeniza por agitación del frasco, hasta que se comienza a enfriar. Cuando la mezcla alcanza menos de 65°C, se agregan la clorotetraciclina y la mezcla de vitaminas.

<sup>1</sup> Consultor privado. Guápiles, Limón, Costa Rica.

<sup>2</sup> Natural Resources Institute (NRI), Central Avenue, Chatham Maritime, Kent ME4 4TB, Reino Unido.

<sup>3</sup> Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), Santo Domingo, República Dominicana.

<sup>4</sup> Unidad de Fitoprotección, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. lhilje@catie.ac.cr

**Cuadro 1.** Ingredientes y cantidades necesarias para preparar un litro de dieta para larvas de *H. grandella*.

Producto	Cantidad
Germen de trigo	120 g
Azúcar	30 g
Caseína	20 g
Agar	20 g
Levadura de cerveza	15 g
P-hidroxibenzoato metílico (MHP)	1 g
Colesterol	0,2 g
Sales de Wesson	10 g
Acido sórbico	2 g
Semilla molida de cedro	2 g
Agua destilada	850 ml
Clorotetraciclina	0,3 g
Mezcla de vitaminas	15 g

Esta cantidad de dieta permite abastecer unos 160 frasquitos de 30 ml, colocando 6 ml de dieta por frasco, lo cual es suficiente para que la larva de *H. grandella* pueda alimentarse por unas dos semanas. Cuando las características organolépticas de la dieta cambian, al iniciarse su descomposición, las larvas deben trasladarse a otro frasco con dieta fresca. Aunque la dieta no usada puede mantenerse en refrigeración, es preferible utilizar dieta fresca. Asimismo, los residuos de dieta dejados por las larvas y en estado de descomposición, deben descartarse con cuidado, para no provocar una diseminación de hongos o bacterias en el ambiente del laboratorio.

**Cría.** Al obtener pupas, éstas se colocan en el piso de una jaula hecha con malla fina (malín) (Fig. 1), para que al emerger los adultos, unos 10 días después, copulen y ovipositen.

Se trata de una jaula grande (55 x 50 x 45 cm), con una manga que desemboca en una abertura en una de sus paredes, para poder manipular los insectos. Se debe colgar, mediante gazas ubicadas en sus vértices, de las esquinas de un marco fuerte (60 cm de fondo y de ancho, y 65 cm de altura), hecho con varilla de construcción redonda, de  $\frac{1}{4}$  de pulgada.

A su vez, los marcos deben colgarse del techo mediante un hilo de nailon, delgado pero fuerte, para evitar el acceso de las hormigas y que se coman las pupas o adultos de *H. grandella*. Es recomendable colgar estos marcos en un sitio fresco y con muy buena ventilación pues, de otra manera, no se obtienen huevos. En nuestra experiencia,

normalmente se colocaron dentro de un invernadero, a 1,5 m de altura, en una sección cubierta por un techo de láminas de metal, para que la radiación no incidiera directamente sobre la jaula.

Las hembras depositan los huevos en la malla de la jaula; inicialmente son blancos o amarillentos y, si están fértiles, se tornan rojos en unas 24 h. Los huevos se pueden recolectar día de por medio, para la cual se desprende la malla del marco y se sumerge por 3 h en una palangana plástica con agua del tubo, ojalá de un color que contraste bien con el rojo de los huevos. Al agitar la malla suavemente, los huevos se desprenden y, al mover el agua con agitación centrífuga, ellos se concentran en el centro de la palangana, de donde son tomados fácilmente con una jeringa sin aguja, de 10 ml de capacidad.

Los huevos se deben dejar acumular cerca del orificio de salida de la jeringa, y se depositan en pequeñas cantidades sobre trozos de papel toalla de 5 x 5 cm. El volumen extraído es suficiente para surtir con huevos cuatro o cinco de estos trozos, los cuales se colocan sobre un papel toalla grande y seco para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, los papeles toalla con los huevos se colocan entre hojas jóvenes de cedro, en forma alterna de un papel por cada cuatro hojas, como un manojo o "sandwich", para que, al nacer, las larvas encuentren alimento; las hojas deben ser tiernas pero bien formadas, y estar frescas. El manojo se coloca dentro de una caja plástica semitransparente, deseablemente hermética (Fig. 2), y se prensa un trozo de papel toalla humedecido, con la tapa de éste.

Las larvas nacen 3-7 días después de depositados los huevos, y unos siete días después alcanzan el instar III. Las hojas se deben reemplazar cada 2-3 días por hojas frescas. Para disponer de hojas frescas siempre, éstas se pueden almacenar envueltas en servilletas húmedas, dentro de bolsas plásticas, en la refrigeradora.

Las larvas en el instar III, cuyo tamaño es de 5-6 mm, se deben transferir a frasquitos con dieta artificial, para que completen su desarrollo. Deben colocarse en forma individual, debido a su fuerte tendencia al canibalismo. Además, es recomendable utilizar frasquitos de vidrio y con tapa de plástico duro y de rosca, como los que se emplean para algunos ungüentos medicinales (Fig. 3). La experiencia ha demostrado que si se utilizan frasquitos plásticos con tapas de cartón o plástico suave, como las usadas



**Figura 1.** Jaula de malin, colgando de un marco de metal, para la cópula y oviposición de *H. grandella* (Foto: Francisco Soto).



**Figura 2.** Dispositivo para la cría de los primeros instares larvales de *H. grandella* (Foto: Francisco Soto).



**Figura 3.** Frasquito con dieta artificial, para la cría de las larvas de *H. grandella* (Foto: Francisco Soto).

normalmente para criar otros insectos, las larvas los perforan fácilmente y escapan.

Los frasquitos se debe colocar invertidos, debido al comportamiento de las larvas de caminar en dirección hacia arriba. Para facilitar su manipulación, ellos se deben colocar sobre bandejas plásticas, ya sea a la temperatura del laboratorio o dentro de cámaras bioclimáticas, donde las variables climáticas se pueden manipular. En caso de que la temperatura sea muy alta, se recomienda colocar un trozo de papel toalla humedecido en cada frasquito, prensado con la tapa de éste, para mantener suficiente humedad y evitar la desecación. Puesto que los frasquitos están invertidos, es fácil humedecer periódicamente el papel toalla y mantener la humedad internamente. Dependiendo de la temperatura, se recomienda adicionar 0,5 ml de agua al trozo de papel toalla, ya sea diariamente o día de por medio.

La duración total del estadio de larva es de 66, 39, 19 y 17 días, a temperaturas constantes de 15, 20, 25 y 30°C, respectivamente; por su parte, la pupa dura 29, 19, 13 y 10 días, respectivamente.

## Aplicaciones

Hay numerosos tipos de estudio, referidos a la biología, la ecología y el manejo de *H. grandella*, para los cuales es importante y necesario contar con protocolos para su cría masiva, como el descrito aquí. Por tanto, a continuación se incluyen algunas sugerencias que podrían ser útiles en cuanto a necesidades específicas de algunos tipos de estudio.

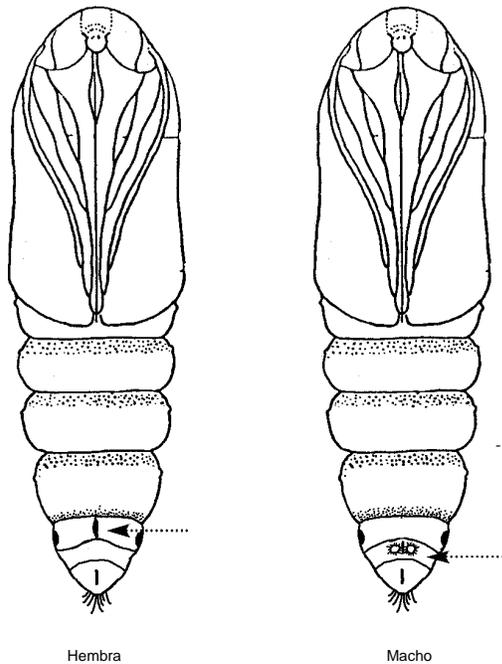
Por ejemplo, éste ha sido muy útil y funcional para estudiar en detalle el **ciclo de vida** de dicho insecto en

respuesta a la temperatura, lo cual se hizo en cámaras bioclimáticas (Percival I-35L), en las que se pueden controlar la temperatura y el fotoperíodo. Al respecto, se recomienda mantener un fotoperíodo cercano a 12:12 h (luz: oscuridad), más cercano a la realidad en el campo en los trópicos. No obstante, puesto que la larva en el campo permanece dentro del tallo de los árboles, en un ambiente oscuro, se ha elegido, con éxito, uno de 8:16 h, que a la vez da un plazo amplio de horas de luz para manipular el material en el laboratorio, sin afectar su comportamiento diario. En estos casos, se ha trabajado con valores de humedad relativa de 85-95%.

Debe tenerse presente que, durante su desarrollo, las larvas mudan su piel al cambiar de instar, los cuales normalmente corresponden a seis, aunque a menores temperaturas podría haber hasta ocho instares. En cada instar cambia el tamaño de la cápsula cefálica, el volumen y longitud corporal, y el color. En los primeros instares las larvas son de color crema-rosado, y en el V y VI instares son verde-azuladas.

Para efectuar estudios relacionados con el **comportamiento sexual**, así como con la síntesis de la **feromona sexual** de *H. grandella*, es importante determinar la proporción de sexos en una población. Para hacer esto, a las pupas se les puede examinar su genitalia, externamente. En la hembra, el VIII segmento abdominal está dividido en su mitad por la abertura genital (AG), mientras que en el macho ésta aparece desplazada hacia el IX segmento y está acompañada por dos pequeños abultamientos (Fig. 4).

En cuanto a estudios relativos a la longevidad de ambos sexos y el período de oviposición de las hembras, es



**Figura 4.** Pupas de ambos sexos de *H. grandella*, resaltando la abertura genital (AG), que es la estructura clave para diferenciar los sexos (Redibujado de Hidalgo-Salvatierra 1973b).

difícil efectuarlos dentro de cámaras bioclimáticas, ya que las parejas de *H. grandella* no copulan cuando están en espacios cerrados, aunque las jaulas sean grandes y bien ventiladas. Al parecer, para lograr la cópula se requiere que haya corrientes de aire dentro de la cámara, pues la actividad de vuelo influye mucho sobre la cópula y la oviposición.

Asimismo, para determinar la actividad de cópula, se puede hacer una disección de la "vagina" (*bursa copulatrix*). La hembra de *H. grandella* copula solamente una vez, durante lo cual el macho le inserta un solo espermátforo en la bursa; ésta se puede abrir con una aguja fina y adentro aparecerá pequeño "saco" o glóbulo endurecido, el cual contiene los espermatozoides.

Finalmente, en cuanto a estudios para el posible manejo de *H. grandella* mediante **sustancias inhibidoras de la alimentación** (fagodisuasivas) de las larvas, no es conveniente utilizar la dieta artificial en forma directa, ya que si dichas sustancias se mezclan con la dieta, podrían afectar a la larva no solo por ingestión, sino también por

contacto, y sería muy difícil distinguir entre sus efectos fagodisuasivo o tóxico. Por tanto, lo recomendable es trabajar con larvas algo grandes (instar III), las cuales se colocan individualmente en frasquitos donde se deposita un pequeño disco de hoja de cedro previamente sumergido en la solución del respectivo tratamiento. Después de 24 h de exposición al disco, cada larva se separa de su disco y se coloca en un frasquito con dieta, para valorar los efectos posteriores de cada sustancia.

## Agradecimientos

A la Dra. Carrie Hauxwell (IERM, Reino Unido), quien incentivó y apoyó el desarrollo del protocolo de cría, así como los aportes de Fernando Mancebo, Douglas Cubillo, Guido Sanabria y Arturo Ramírez.

## Literatura citada

- Grijpma, P. 1973. Observations on a rearing technique and host selection behavior of adults in captivity. In Grijpma, P. Ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. San José, Costa Rica. IICA Miscellaneous Publication No. 101. v. 1. p. 50-60.
- Hidalgo-Salvatierra, O. 1973a. Dos dietas aptas para la cría de *Hypsipyla grandella* (Zeller). In Grijpma, P. Ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. San José, Costa Rica, IICA Miscellaneous Publication. No. 101. v. 1. p. 91.
- Hidalgo-Salvatierra, O. 1973b. Determinación del sexo en pupas. In Grijpma, P. Ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep., Pyralidae. San José, Costa Rica. IICA Miscellaneous Publication No. 101. v. 1. p. 67.
- Hidalgo-Salvatierra, O.; Berrios, F. 1973. Growth of larvae reared on a synthetic diet. In Grijpma, P. Ed. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. San José, Costa Rica. IICA Miscellaneous Publication. No. 101. v. 1. p. 77-80.
- Lara, L. 1974. Algunos aspectos en la biología, desarrollo y reproducción de *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) en condiciones de laboratorio. M.Sc. Thesis. Seattle, University of Washington. 77 p.
- Mancebo, F. 1998. Efectos de extractos vegetales sobre la alimentación y el desarrollo de larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller). Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 83 p.
- Soto, F. 2000. Efectos de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) y su sistemicidad en árboles de cedro. Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica, CATIE 104 p.
- Taveras, R. 1999. Aspectos bioecológicos y caracterización del daño de *Hypsipyla grandella* (Zeller) en caoba, en Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 83 p.