



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EFFECTOS DE SELECCIÓN ENTRE HOJAS SANAS E INFECTADAS CON UN
LARVICIDA A BASE DE *Bacillus thuringiensis* Y SU EFICIENCIA COMO
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LAS LARVAS DE *Hylesia metabus*
CRAMER (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)
(Modalidad: Investigación)

FINORDYS DE LOS ÁNGELES MUÑOZ DÍAZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS.

CUMANÁ, 2009

EFFECTOS DE SELECCIÓN ENTRE HOJAS SANAS E INFECTADAS CON UN
LARVICIDA A BASE DE *Bacillus thuringiensis* Y SU EFICIENCIA COMO
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LAS LARVAS DE *Hylesia metabus*
CRAMER (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)

APROBADO POR:

Prof. Marcos De Donato
Asesor Académico

Lic. Sandra Díaz
Coasesor

Prof. Isabel Mimbela
Jurado Principal

Prof. Melfran Herrera
Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	10
Colecta de las larvas	10
Mantenimiento de las larvas	10
Preparación de las soluciones del larvicida Dipel®	11
Preparación de discos de hojas sanos e infectados	11
Experimento.....	12
Comportamiento de alimentación.....	13
Análisis estadístico	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso por estar siempre conmigo e iluminar y bendecir cada paso de mi vida.

Mi hijo Kevin por ser el regalo más hermoso que he recibido y por entender a su manera mi ausencia. ¡TE AMO!

Frank, por estar a mi lado dándome su apoyo, su ayuda y su cariño incondicional. ¡TE AMO!.

Mi madre por darme la vida.

Mi abuela Josefina por ser mi otra madre, por ayudarme, por hacer de mí quien soy.

Mis hermanas: Norfraidys, Fraicedys y Norian; espero ser un buen ejemplo.

Mis amigas: Dianny, Diorelis, Candy, Fabiana, Yndira, Maira, Yelitza y Jenire. Muy especialmente a Tivardy por estar a mi lado en los momentos buenos pero sobre todo por su solidaridad en los malos.

Todas aquellas personas que influyeron de una u otra manera en mi formación personal.

AGRADECIMIENTOS

A

La Dra. Frances Osborn por asesorar, en primera instancia, este trabajo de investigación.

El Dr. Marcos De Donato por aceptar asesorar este trabajo de investigación.

La Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Región XI, al personal que labora en esta institución por el apoyo prestado, especialmente los que trabajan en la Demarcación B de Guaraunos, por el alojamiento durante la ejecución de este trabajo y apoyo técnico en la colecta de las larvas.

Al personal que labora en el Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO), por la colaboración prestada.

La Lcda. Sandra Diaz por la ayuda en el manejo de las muestras.

La Prof. Yelixse Navarro por su ayuda y apoyo incondicional ¡GRACIAS!.

La Sra. Mirian Parra por sus consejos.

A TODOS MIL GRACIAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de hojas infectadas consumidos por las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del tercer, cuarto y quinto instares dependiendo de la concentración de Dipel® utilizada.	25
Tabla 2. Formación de grupos según prueba “ <i>a posteriori</i> de Duncan” dependiendo la concentración de Dipel® utilizada.....	26
Tabla 3. Comportamiento de alimentación de hojas infectadas dependiendo si sobreviven o no las larvas de <i>Hylesia metabus</i> al final del ensayo, para el tercer, cuarto y quinto instares.	26
Tabla 4. Análisis de test de signo de los tercer, cuarto y quinto instares de las larvas de <i>Hylesia metabus</i>	27
Tabla 5. Análisis Probit para determinar la concentración mortal del 50% de las larvas de <i>H. metabus</i> del tercer, cuarto y quinto instares expuestas a diferentes concentraciones del Dipel ®.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Adulto de <i>Hylesia metabus</i>	2
Figura 2. Larva de <i>Hylesia metabus</i>	2
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Hylesia metabus</i>	3
Figura 4. Dermatitis provocada por <i>Hylesia metabus</i>	5
Figura 5. Mortalidad de las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del tercer instar durante seis días tratadas con una formulación de Dipel®.	16
Figura 6. Frecuencia acumulada de larvas de <i>Hylesia metabus</i> del tercer instar muertas a los seis días después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.	16
Figura 7. Porcentaje de discos de hojas consumidos por las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del tercer instar, a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.	18
Figura 8. Mortalidad de las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del cuarto instar, durante seis días tratadas con una formulación de Dipel®.	19
Figura 9. Frecuencia acumulada de larvas de <i>Hylesia metabus</i> del cuarto instar muertas a los seis días después de la infección tratadas con una formulación de Dipel®.	19
Figura 10. Porcentaje de discos de hojas comido por larvas de <i>Hylesia metabus</i> del cuarto instar a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.	20
Figura 11. Mortalidad de las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del quinto instar durante seis días tratadas con una formulación del Dipel®.....	21
Figura 12. Frecuencia acumulada corregida, según la fórmula de Abbott (1925), de larvas de del Dipel®. <i>Hylesia metabus</i> del quinto instar muertas a los seis días después de la infección tratadas con una formulación.	22
Figura 13. Porcentaje de discos de hojas comidos por las larvas de <i>Hylesia metabus</i> del quinto instar a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación del Dipel®....	23

RESUMEN

Hylesia metabus es una polilla, la cual posee setas urticantes que causan dermatitis severa en humanos. Aunque se conoce que se alimenta de diversas plantas, las hospederas principales son *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, lo que ha restringido su distribución en la región nor-oriental de Venezuela a las zonas de manglar. Se evaluaron los efectos de selección de hojas sanas e infectadas con el larvicida Dipel®, y su efecto como controlador biológico de las larvas de *Hylesia metabus*. Se colectaron larvas de segundo, tercero y cuarto instar en Caño de Ajíes, municipio Benítez, y se trasladaron al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO) en cavas de anime, dentro de las cuales se colocaron hojas frescas de *L. racemosa*. Se prepararon las diferentes soluciones del larvicida Dipel® a 4, 16, 64, 256 y 1 024 ppm. Se estudiaron 125 larvas para cada instar y se realizaron 3 réplicas para los tercer y cuarto instares y 2 réplicas para el quinto instar. Las larvas fueron expuestas a soluciones de diferentes concentraciones para observar el comportamiento de éstas frente al insecticida. Los resultados de consumo de discos de hojas expuestas a distintas concentraciones de Dipel® para los tres instares mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se observó la formación de dos grupos de promedios para las larvas del tercer instar, con el control siendo diferente a la concentración de 1 024 ppm, tres grupos para las larvas del cuarto instar y cuatro grupos para las larvas del quinto instar, con el control diferente a los de las concentraciones de Dipel®. Además, se evidenció que no hubo preferencias de alimentación ($p > 0,05$) entre los discos sanos e infectados para las larvas del tercer instar, mientras que para las del cuarto instar, en general, se observó una disminución del consumo de hojas a mayores concentraciones y las del quinto instar tuvieron preferencia por los discos sanos. En conclusión, se evidenció que al aumentar la concentración del producto se reduce la cantidad de hoja comida por las larvas, además que la eficacia del insecticida Dipel® es afectado por la edad de las larvas y resultó ser más eficaz en matar larvas del quinto instar seguido por las larvas del tercer instar y por último larvas del cuarto instar.

INTRODUCCIÓN

Hylesia metabus en Venezuela, es conocida como “palometa peluda”, pertenece al orden Lepidoptera, superfamilia Bombycoidea, familia Saturniidae, subfamilia Hemileucinae (Osborn y cols., 2001).

El género *Hylesia* esta circunscrito sólo al continente americano (Harwood y James, 1979), con una distribución geográfica que comprende a México, Costa Rica, Surinam, Brasil, Uruguay, Argentina, Perú, Trinidad, Guayana Francesa, Guayana Inglesa y Venezuela, siendo en estos últimos cuatro países donde se han reportado la misma especie: *Hylesia metabus* (Boyé, 1932; Gusmao y cols., 1961; Jorg, 1969; Pesce y Tejada, 1969; Germanetto, 1982; Vásquez y Olivares, 1984; Dinehart y cols., 1985; Reitz y Smith, 1985).

La distribución nacional de *H. metabus* abarca tres regiones: la región Occidental que incluye al estado Zulia entre las zonas de Concha (sub-región húmeda del Sur del Lago de Maracaibo) y El Concejo, Municipio Bolívar (sub-región seca del estado) (Dao, 1966); la región central que incluye al estado Miranda; y la región Oriental con la mayor área de distribución para el país, que abarca el Golfo de Paria del estado Sucre, incluyendo los municipios Mariño, Cajigal, Benítez, Libertador, Andrés Eloy Blanco, Arismendi, Bermúdez y Ribero; el estado Monagas a los municipios Bolívar, Maturín y Sotillo; el estado Delta Amacuro, la zona comprendida entre Pedernales y Tucupita, y en la Isla de Coche del estado Nueva Esparta (Vásquez, 1994).

El adulto de esta polilla varía entre 1,7 y 2,4 cm de longitud (Figura 1). Se caracteriza por poseer un cuerpo robusto de color marrón – amarillento, densamente cubierto de setas, encontrándose una mayor cantidad de éstas en su abdomen.



Figura 1. Adulto de *Hylesia metabus*. Fuente: proporcionada por la Dra. Frances Osborn

Se ha determinado que la hembra de esta polilla presenta tres tipos de setas en la zona abdominal, de las cuales posiblemente dos sean verdaderamente urticantes. Estas polillas usan sus setas para cubrir y proteger los huevecillos de parásitos y depredadores (Lundberg y cols., 2002).

Por otra parte, la larva es de color marrón oscuro a negro, presenta en cada segmento de su cuerpo grupos de setas urticantes arregladas en arcos dorso-laterales. La cabeza es de color ámbar brillante y las setas del protórax emergen como una corona en su parte posterior (Figura 2). Su tamaño en completo desarrollo varía entre 4,3 y 4,8 cm (Vásquez, 1994).



Figura 2. Larva de *Hylesia metabus*. Fuente: proporcionada por la Dra. Frances Orborn

H. metabus cumple un ciclo biológico cuya duración varía entre 97 y 105 días (101,4 +/- 4,22 días) desde su estado embrionario hasta su estado adulto. Dentro de este ciclo, el período embrionario tarda alrededor de 26 días (26 +/- 0,15 días) (Vásquez, 1990). Luego de la eclosión, las larvas pasan por siete instares de desarrollo,

morfológicamente caracterizados por el tamaño de la cápsula cefálica del insecto (Vásquez, 1994), cada uno con una duración entre 7 a 9 días: instar I (8,5 días), instar II (7,8 días), instar III (7,7 días), instar IV (7,7 días), instar V (8,2 días), instar VI (8,7 días) e instar VII (9,3 días). Finalmente, la etapa de pupa dura 19 días (Figura 3) (Vásquez, 1990).



Figura 3. Ciclo biológico de *Hylesia metabus*. Fuente: proporcionada por la Lic. Sandra Díaz.

Las fases inmaduras de su ciclo de vida lo cumple en las plantas hospederas, de las cuales se han reportado hasta catorce especies. Dentro de ese grupo existen varias especies de mangle que constituyen el hospedero natural y medio propio de la “palometa”, estas son principalmente el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), siendo el *Rhizophora mangle* el hospedero preferido por esta especie (Vásquez, 1994). Esto parece haber restringido la distribución de *H. metabus* al oriente de Venezuela, a zonas de la península de Paria, estado Sucre (municipios Mariño, Cajigal, Benítez y

Libertador), zonas del estado Monagas (municipios Bolívar, Maturín, Sotillo) y zonas del estado Delta Amacuro (municipios Pedernales y Tucupita). Sin embargo, observaciones de campo sugieren que *H. metabus* también puede alimentarse de hojas de las plantas, *Psidium guajaba* (guayaba), *Hura crepitans* (jabillo), *Anacardium occidentale* (merey), *Syzygium alaccense* (pomalaca), *Syzygium cumini* (uva pesjua) y *Erythrina poeppigiana* (bucare), entre otros (Vázquez, 1990).

Las altas poblaciones de *H. metabus* en el estado Sucre, han causado que en tiempos recientes, este insecto (en su estado adulto) haya llegado a los poblados de San Juan de Las Galdonas, Río Caribe, Carúpano y Casanay, entre otros. Sumado a esto, si *H. metabus* logra completar su desarrollo sobre las otras especies de plantas arriba mencionadas, existe un peligro potencial de que pueda extender su área de distribución. Al respecto, en el año 2000, durante los meses de enero y febrero, los habitantes de San Juan de Las Galdonas reportaron haber visto altas densidades de larvas de *H. metabus* sobre árboles de guayaba y uva pesjua, plantas que se encuentran frecuentemente en zonas urbanas (Osborn y cols., 2001).

Se piensa que estas explosiones poblacionales de *H. metabus* en la región oriental se deben a la intervención del hombre, principalmente en la forma de medidas de control erróneas usadas contra este insecto. Por ejemplo, en el período 1970-74 se hizo uso de insecticidas químicos en los manglares de la península de Paria (estado Sucre) con el fin de combatir las elevadas poblaciones de larvas de esta polilla que había por esa zona en ese entonces (Vásquez, 1994). Esto pudo haber traído como consecuencia la reducción notable de los enemigos naturales de esta plaga.

En Venezuela, los primeros reportes sobre la incidencia de polillas del género *Hylesia*, corresponden a relatos hechos por pobladores de las áreas afectadas por este insecto en Irapa y Yaguaraparo, estado Sucre (Fornés y Hernández, 2001); quienes señalaron como épocas de incidencia fuerte de la palometa las correspondientes a los años 1960-64, 1970-73 y 1980-87 (Vásquez, 1994). Según Martínez (1986), el primer

registro escrito se remonta al año 1937, cuando se presentó un brote de esa polilla en el caño San Juan, cerca de Caripito, estado Monagas.

El efecto de *H. metabus* se manifiesta como una dermatitis urticante, que puede variar de uno a otro individuo; en unos puede presentarse como una pápula magnificada y en otros se puede observar como pápulas eritematosas y con edema de grado variable (Figura 4) (Pinto y cols., 1992). También puede darse en la forma de una urticaria generalizada (Fornes y Hernández, 2001).

Al igual que en el resto de los pruritos generados por insectos, las zonas afectadas son usualmente las extremidades, ya que estas zonas son las que están más expuestas al contacto con éstos. Aunque, tal como se puede apreciar en la fotografía (Figura 4), cualquier zona expuesta es posible que sea afectada.

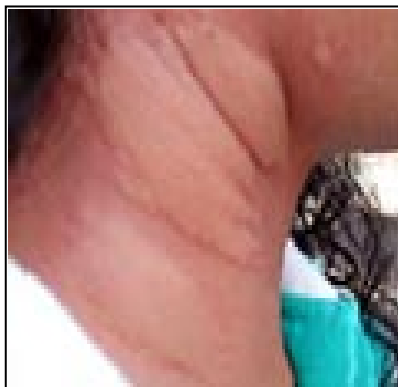


Figura 4. Dermatitis provocada por *Hylesia metabus*. Fuente: proporcionada por la Dra. Frances Osborn

Si ocurren contactos repetidos con las setas urticantes, las lesiones cutáneas pueden tardar semanas o aún meses en desaparecer, causando infecciones secundarias (Boyé, 1932; Jörg, 1969 y Pesce y Tejada, 1969). De lo contrario, la dermatitis se mantiene entre tres y siete días, lo cual es su tiempo promedio de duración estimado (Jörg, 1969).

La reacción alérgica observada ocurre en las personas que en alguna ocasión reciben, o bien el contacto directo con este lepidóptero, o bien con sus setas urticantes, ya que estas últimas suelen desprenderse con facilidad del cuerpo del insecto y ser acarreadas por el viento, liberadas al medio por miles de hembras que son atraídas por la luz eléctrica del alumbrado público cuando revolotean alrededor de los bombillos durante los períodos de invasión a los poblados (Vassal, 1985).

Estas espículas entran en contacto con la piel de las personas, y con el rascado suelen partirse, liberando de esta manera la sustancia irritante (Fornés y Hernández, 2001). Dicha sustancia urticante es de larga duración, por lo que es peligrosa durante muchos días, semanas, meses y hasta en años posteriores debido tal vez a su estabilidad química (Germanetto, 1982; Dinehart y cols., 1985).

Además de los síntomas cutáneos mencionados anteriormente, también se observan manifestaciones extracutáneas en algunos casos, tales como síntomas respiratorios (Ducombs y cols., 1983; Dinehart y cols., 1985), conjuntivitis, malestar general y artralgia (Dinehart y cols., 1985). Incluso repercusiones psicológicas, tales como insomnio y depresión en personas nerviosas (Germanetto, 1982).

Lundberg y cols. (2002), sostienen que los síntomas de esta dermatitis se acentúan al usar jabón y se mejoran al aplicar soluciones de un pH ligeramente ácido, tales como el vinagre. Las setas de los machos adultos no causan síntomas algunos. Además, hay evidencias que señalan que algunos individuos que han tenido contacto con las polillas, son asintomáticos. Esto puede deberse a que estos individuos son nativos del área endémica, a diferencia de lo observado en los extranjeros, quienes desarrollan dermatitis en un alto porcentaje, por lo que se cree que los nativos desarrollan cierto tipo de inmunidad o resistencia. Sin embargo, algunos investigadores niegan esta versión, ya que éstos, por el contrario, desarrollan hipersensibilidad y el contacto continuo con las polillas producen erupciones más pronunciadas. Otra explicación en el caso de los

nativos, puede ser que ellos conocen los hábitos de las polillas y toman precauciones necesarias para no ser afectados (Pinto y cols., 1992).

Dinehart y cols. (1987) refieren que una de las sustancias que desencadena la reacción alérgica podría ser la histamina. Por otro lado, Lundberg y cols (2002), utilizando la cromatografía de filtración de geles, dividieron un extracto de los pelos urticantes en cinco fracciones distintas, una de estas fracciones mostró una actividad similar a la calikreina tisular, la cual es una proteasa serina implicada en el sistema fibrinolítico. Estos investigadores concluyeron, que la sustancia parecida a la calikreina, encontrada en los pelos urticantes de la “palometa”, es probablemente en gran parte responsable de la dermatitis experimentada por los afectados.

Las molestias que producen las setas de *H. metabus* son de tal magnitud que constituyen un problema de salud pública de importancia en las zonas donde se encuentran las poblaciones del insecto. Es por ello que se han realizado investigaciones respecto a sus patógenos y otros enemigos naturales, con el fin de utilizarlos en futuros programas de control biológico (Osborn y cols., 2001).

Se ha logrado aislar e identificar del intestino de *H. metabus* enfermas o muertas, varias especies de bacterias entre las que se pueden mencionar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus casseliflavus*, *Rhodococcus spp.* y *Enterobacter cloacae*. De ellas, *P. aeruginosa* produjo porcentajes de mortalidad significativos cuando se infectaron larvas sanas. Sin embargo, esta bacteria resulta ser patógena para los humanos inmunocomprometidos, por lo cual no puede ser usada como control biológico (Osborn y cols., 2002).

Aparte de las bacterias, se ha observado que las larvas de estadíos avanzados en ocasiones han mostrado síntomas que evidencian la presencia de un microsporidio; éstos son parásitos protozoarios que atacan diferentes grupos de insectos, además de otras especies de invertebrados y vertebrados (Osborn, 2002).

A finales del siglo xx 500 especies de insectos eran resistentes a uno o más pesticidas y el número puede aumentar notablemente en pocos años (Macias, 1995). Una posible alternativa para solucionar este problema es el control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente y/o sus productos para reducir los efectos causados por insectos plaga (Galán y cols., 1996). Badii y cols (1996), reporta la existencia de más de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para el control microbiano de insectos, en relación a su diversidad se señalan: hongos, virus, protozoarios y bacterias, en donde las ultimas son de gran importancia.

De las bacterias, la más sobresaliente pertenece al género *Bacillus*. Badii y cols (1996), clasificaron a las bacterias en dos grupos: a) las esporuladas y b) las no esporuladas. La bacteria entomotóxica con mayor potencial para la producción de bioinsecticida es *Bacillus thuringiensis* (Btk), la cual se ha explotado comercialmente; de manera amplia. En el segundo lugar de frecuencia de uso se ubica a *B. popillae* y más recientemente *B. sphaericus* y *B. morati* que tienen valor reconocido en el control de plagas urbanas como los mosquitos, vectores de paludismo, dengue, etc. (Badii y cols., 1996).

Es importante destacar que a pesar de la alta efectividad que han mostrado los bioinsecticidas elaborados con especies de *Bacillus*, presentan problemas que deben ser resueltos. Su aplicación por ejemplo, debe ser repetida cada tres meses porque pierde actividad, algunos deben ser aplicados cada semana, como sucede con algunas formulaciones de Bti en el combate de mosquitos y los costos, cuando se tratan grandes áreas, son elevados.

Actualmente, los entes gubernamentales responsables del manejo de esta plaga, están utilizando para el control de las larvas, el producto comercial llamado Dipel® a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, el cual ha sido extensivamente utilizado para el control de plagas del orden Lepidoptera. Esta bacteria es aeróbica, gram positiva

y se caracteriza por la producción de un cristal proteico durante su fase de esporulación, el cual contiene las proteínas insecticidas (Schnepf y Whiteley, 1985). Dicho cristal, al ser ingerido por el insecto, se convierte en una toxina activa (ζ -endotoxina) en el intestino, formando canales que permiten el libre flujo de iones, lo cual produce un desbalance osmótico en las células afectadas y la destrucción del tejido intestinal, causando finalmente la muerte del insecto (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf y cols., 1998; Maagd y cols., 2003).

El Dipel® es aplicado, principalmente por vías fluviales y aérea sobre poblaciones de larvas de *H. metabus*, durante el tercer hasta el quinto estadio, ya que es donde ha mostrado mayor actividad. Estudios preliminares de laboratorio han revelado que la eficacia de este producto es afectado por la edad de las larvas, y la capacidad de las mismas de rechazar hojas infectadas (Osborn, comunicación personal). Por lo tanto, es importante asegurar que se está utilizando la dosis correcta para generar un alto porcentaje de mortalidad de los estadios larvales blanco. Por tal razón, el objetivo de este trabajo es el de estudiar los efectos de la selección entre hojas sanas e infectadas con un larvicida a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, y su eficiencia como controlador biológico de las larvas de *H. metabus*.

METODOLOGÍA

Colecta de las larvas

Las larvas se colectaron de las zonas de manglares cerca de la población de Caño de Ajíes, municipio Benítez, específicamente en: Paradero, Los Barrancos, Caño Sicaina y La Hormiguera de la Parroquia Unión, y en Puerto Caliche, Parroquia El Pilar, del estado Sucre, durante el período comprendido entre abril de 2006 y abril de 2007. Se realizaron colectas repetidas debido a que las larvas no se crían bien en condiciones de laboratorio. A tal efecto, se colectaron larvas de los segundo, tercero y cuarto instares. Las larvas del segundo instar, se utilizaron para los experimentos del tercer instar, las del tercero se utilizaron para los experimentos del cuarto y las del cuarto se utilizaron para los experimentos del quinto. Se colectaron suficientes grupos de larvas para asegurar que hubiese suficiente material biológico de la misma edad en el momento de iniciar los experimentos.

Se realizaron las colectas de masas de larvas siempre de las mismas poblaciones y cada masa se mantuvo por separada en bolsas plásticas con suficientes hojas frescas de la planta hospedera *Laguncularia racemosa* (mangle blanco).

Mantenimiento de las larvas

Las larvas se trasladaron al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO), en cavas de anime, dentro de las cuales se colocaron hojas frescas de *L. racemosa*. Éstas fueron mantenidas en condiciones de 26-28 °C y 70-80% de humedad relativa. Las cavas fueron limpiadas diariamente y se les cambió las hojas viejas por hojas frescas de *L. racemosa*.

Para todos los experimentos se esperó hasta un día luego del cambio de instar y se seleccionaron las larvas del mismo instar, caracterizándose éstas por el tamaño de su

cápsula cefálica.

Preparación de las soluciones del larvicida Dipel®

A partir del larvicida Dipel® a base de *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* el cual contenía 3,5% de ingrediente activo (complejo espora cristal) se procedió a preparar las concentraciones de 4, 16, 64, 256 y 1 024 ppm.

Cálculos de los ppm

$$\text{ppm} = \% \text{IA} * n$$

Donde:

ppm : partes por millón

%IA: ingrediente activo del producto

n: mililitros del producto.

$$1\ 024 \text{ ppm} = 3,5/100 * n$$

$$n = 1024/0,035$$

$$n = 29,25 \text{ ml}$$

Con la utilización de una pipeta se midieron 29,25 ml del larvicida Dipel® y se colocaron en un cilindro graduado de 1 000 ml de capacidad, se enrasó con agua destilada el cilindro hasta su máxima capacidad y de esta manera se obtuvo la concentración más alta, es decir, 1 024 ppm. A partir de esta solución se obtuvieron las otras concentraciones menores, desde la más concentrada hasta la más diluida (4 ppm), por diluciones seriadas de 1:4.

Preparación de discos de hojas sanos e infectados

Se cortaron 300 discos de hojas de *L. racemosa* de 1 cm de diámetro con un cortador de hojas especial, para cada instar, las cuales fueron previamente lavados con

agua destilada. Se sumergieron 25 discos de hojas de *L. racemosa* para cada una de las soluciones preparadas para el tratamiento (4, 16, 64, 256 y 1 024 ppm) (infectados). Además se sumergieron 25 discos en agua destilada para cada tratamiento, estos discos fueron marcados para distinguirlos de los discos con las diferentes soluciones (sanos). Para los controles se sumergieron 50 discos en agua destilada solamente. Luego los discos de cada tratamiento se colocaron, por separado, en papel absorbente para escurrir el exceso de solución y se secaron a temperatura ambiente por evaporación.

Experimento

Se utilizaron 25 recipientes plásticos de 200 ml de capacidad, los cuales fueron previamente lavados y desinfectados, para cada concentración, y 25 recipientes para los controles.

Artículo I.

En total se utilizaron 25 larvas para cada tratamiento y 25 larvas para el control. Inmediatamente, las larvas se colocaron individualmente en los recipientes de plástico, con la ayuda de dos pinceles suaves. Luego se colocaron, un disco sano y un disco infectado en cada uno de los recipientes de las diferentes concentraciones. Para el control se colocaron solo discos sanos. Esto se realizó por separado y para los tres instares. El ensayo se realizó en tres ocasiones diferentes, excepto en el caso de las larvas del quinto instar que por no haber material de campo no se realizaron tres ensayos sino dos.

Después de las primeras 24 horas, las larvas fueron alimentadas diariamente con hojas limpias y frescas de *L. racemosa*, es decir sin Dipel® hasta el sexto día. También se anotaron la mortalidad de las larvas, diariamente, a la misma hora, y el comportamiento de alimentación de las larvas durante un periodo de 6 días. Transcurrido este tiempo se determinó la mortalidad de las mismas.

Comportamiento de alimentación

En las primeras 24 horas se estimó la cantidad de disco de hoja comido por cada larva según el siguiente índice:

- 0: larvas que comieron 0% del disco
- 1: larvas que comieron de 1 a 25% del disco
- 2: larvas que comieron de 26 a 50% del disco
- 3: larvas que comieron de 51 a 75% del disco
- 4: larvas que comieron >75% del disco.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de Chi-Cuadrado (χ^2) para determinar si existió una relación entre el comportamiento de alimentación de las larvas (comió o no comió los discos de hojas en las primeras 24 horas) y la mortalidad final de las mismas. Esta prueba nos permite determinar si existe una relación entre dos variables categóricas. Es necesario resaltar que esta prueba nos indica si existe o no una relación entre las variables, pero no indica el grado o el tipo de relación; es decir, no indica el porcentaje de influencia de una variable sobre la otra o la variable que causa la influencia (Siegel y Castellan, 1988).

Se realizó una ANOVA para determinar si existieron diferencias significativas del consumo de hojas infectadas dependiendo de la concentración y dependiendo de la supervivencia. La prueba de análisis de varianza, sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos, y se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones. Además, a los promedios que mostraron diferencias significativas en el ANOVA, se les aplicó una prueba “*a posteriori*” de Duncan para poder observar la formación de grupos con promedios de consumos similares.

El análisis de los datos de selección se efectuó con una prueba de signo (Siegel y Castellan, 1988). Para ello se anotó el porcentaje de los discos de hojas sanas e infectadas comido por cada larva, y se evaluó si las larvas comieron más de las hojas sanas comparadas con las hojas infectadas, según la siguiente formula:

$$Z = \frac{2X+1-N}{\sqrt{N}}$$

Donde:

Z= probabilidad de distribución normal.

X= n° de larvas que comieron más discos de hojas sana que infectada.

N= n° total de larvas.

Se efectuó un análisis de regresión Probit (Finney, 1971) para determinar la concentración letal CL₅₀, que consiste en obtener la concentración del producto necesario para matar el 50% de las larvas. Este análisis es un método de regresión logarítmico-lineal que permite hacer predicciones sobre los valores de cierta variable Y (dependiente) ajustados a la media de la desviación estándar, a partir de los de otra X (independiente) transformados a logaritmo base 10, entre los que existe una relación Dosis-Respuesta.

Se utilizó la fórmula de Abbott para la corrección de la mortalidad en los casos en que ésta se encontró entre el 5-20% en el control (Abbott, 1925). Cuando la mortalidad del control es menor al 5% esta formula no se utilizó porque se considera que no es significativa la mortalidad; mientras que cuando esta se excede del 20% en los controles, se repitió la experiencia, ya que no se puede discriminar la causa de mortalidad.

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = (X-Y/X) \times 100$$

X= % de larvas vivas en el control.

Y= % de larvas vivas en el tratamiento.

En esta experiencia fue necesaria la utilización de esta fórmula sólo en las larvas de los controles de quinto instar, ya que en éstas excedió el 5% de mortalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 5-6 muestran la mortalidad acumulativa durante seis días posteriores a la infección de las larvas de *Hylesia metabus* del tercer instar, tratadas con una formulación del Dipel®.

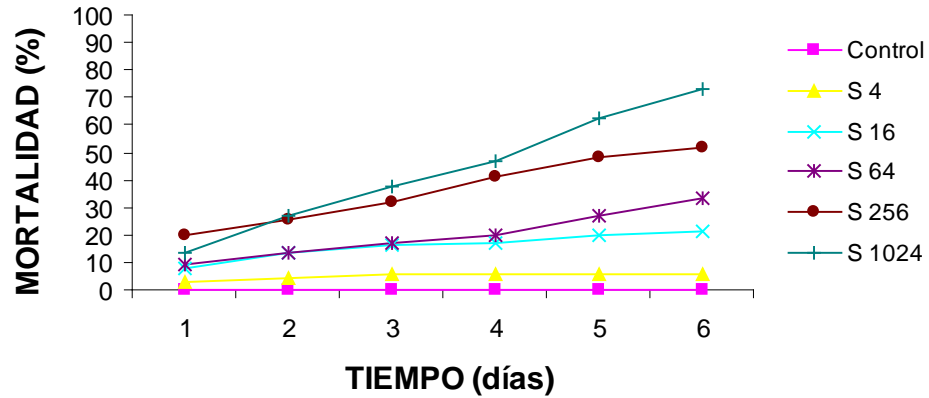


Figura 5. Mortalidad de las larvas de *Hylesia metabus* del tercer instar durante seis días tratadas con una formulación de Dipel®.

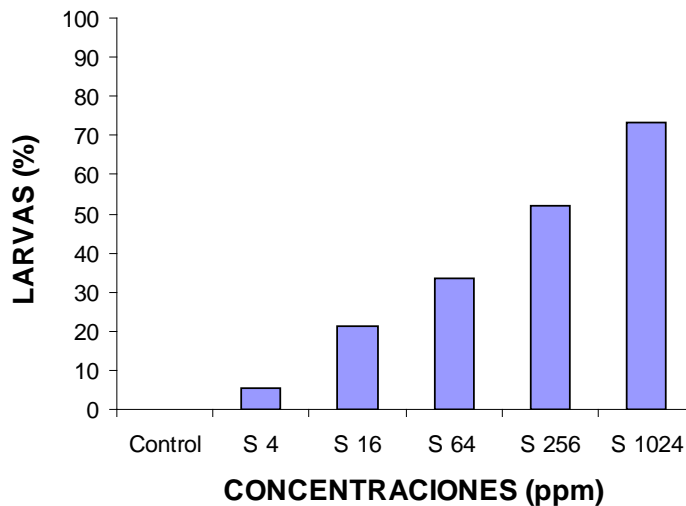


Figura 6. Frecuencia acumulada de larvas de *Hylesia metabus* del tercer instar muertas a los seis días después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.

Se puede apreciar que la solución de 1 024 ppm produjo una mortalidad mucho mayor que las demás soluciones, resultando en una mortalidad de las larvas de un 26,7% después de las primeras 48 horas, y un 73,3% luego de los seis días (Figura 5). Como es de notar, la mortalidad no alcanzó el 80%, esto se podría explicar en parte por el hecho que muchas de las larvas comieron muy poco de los discos de hojas infectadas. Además, se observa que la mortalidad aumenta gradualmente a medida que aumentan las concentraciones del Dipel ®, es decir, que la mortalidad es directamente proporcional a la concentración, por lo tanto la solución que produjo una menor mortalidad fue la de 4 ppm y la mayor la de 1 024 ppm. También se observa que no hubo mortalidad de las larvas control.

La figura 7 muestra el porcentaje de discos de hojas infectadas consumidos por las larvas del tercer instar luego de las primeras 24 horas después de la exposición. Se observa que la mayoría de las larvas no comieron de los discos de hojas, tanto para los controles como para los tratados con la solución. Solo 33,3% de las larvas del control comieron de 1-25% del disco de la hoja infectada, mientras que entre el 22,7-44,0% de las larvas con las soluciones comieron entre 1-25% y un pequeño porcentaje de las larvas, 1,33% (64 ppm) y 5,33% (4 ppm), comieron de 26-50%. También se aprecia que no hubo larvas que comieran más de 51% del disco, ni las del control ni las tratadas con las diferentes soluciones del Dipel ®, es decir, que la mayoría de las larvas no comieron de los discos de hojas infectadas tal como se muestra en la figura 7. Observaciones de laboratorio indican que las larvas de los primeros instares comen muy poco por ser más pequeñas que otros instares más avanzados (Obs. personal).

En la figura 8 se pueden apreciar tres grupos, en el primero se muestra que la solución de 4 y 16 ppm produjeron mortalidades muy similares entre si 5,33% y 8,00% respectivamente. La solución de 256 ppm con un porcentaje de mortalidad de 13,33%. Y por último, las soluciones de 1 024 y 64 ppm que fueron las que produjeron un mayor porcentaje de mortalidad 32% y 37,33% respectivamente. A diferencia del ensayo con las larvas del tercer instar, este ensayo arrojó un mayor porcentaje de mortalidad con la

concentración de 64 ppm; es decir que hay un ascenso de la mortalidad de las larvas para luego descender con la concentración de 256 ppm y finalmente aumenta con la concentración de 1 024 ppm (Figura 9). La figura también muestra que no hubo mortalidad en las larvas del control.

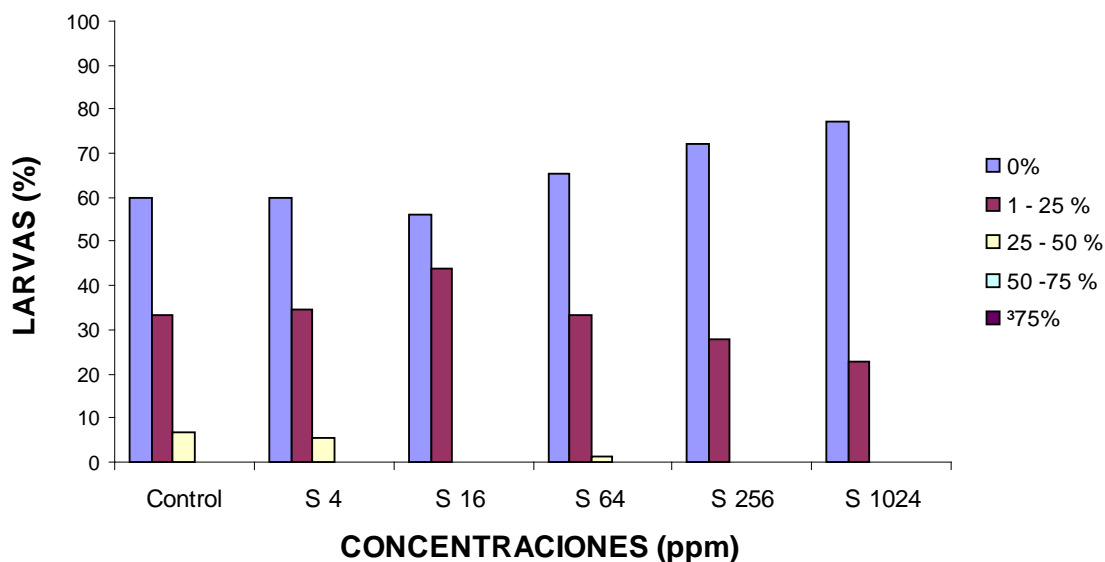


Figura 7. Porcentaje de discos de hojas consumidos por las larvas de *Hylesia metabus* del tercer instar, a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.

Las figuras 8-9 muestran la mortalidad acumulativa durante seis días posteriores a la infección de las larvas de *H. metabus* del cuarto instar tratadas con la formulación bajo estudio.

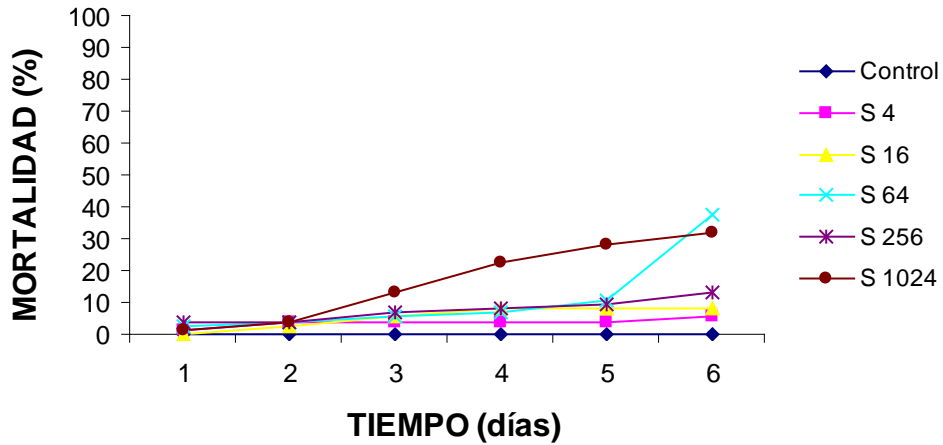


Figura 8. Mortalidad de las larvas de *Hylesia metabus* del cuarto instar, durante seis días tratadas con una formulación de Dipel®.

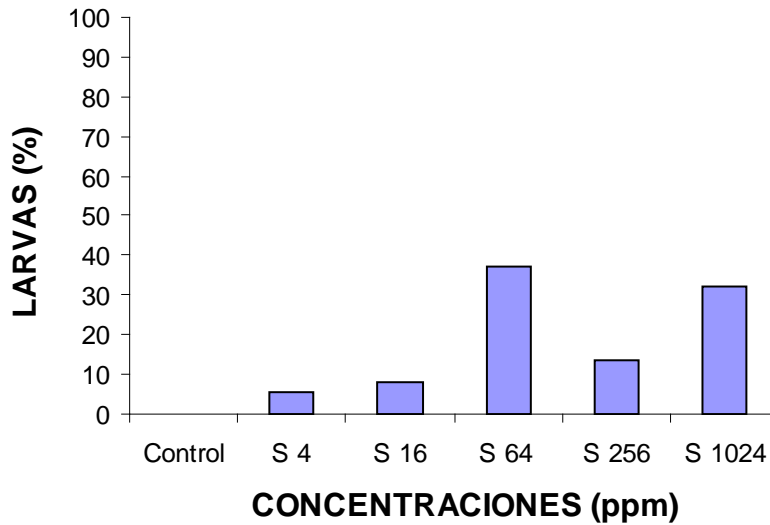


Figura 9. Frecuencia acumulada de larvas de *Hylesia metabus* del cuarto instar muertas a los seis días después de la infección tratadas con una formulación de Dipel®.

La figura 10 muestra el porcentaje de discos de hojas infectadas consumido por las larvas del cuarto instar luego de las primeras 24 horas después de la infección con el Dipel®. Se aprecia que la mayoría de las larvas del cuarto instar comieron una porción mayor del disco infectado en comparación con las larvas del tercer instar, sin embargo, fue el instar donde hubo una menor mortalidad con respecto a los otros dos instares.

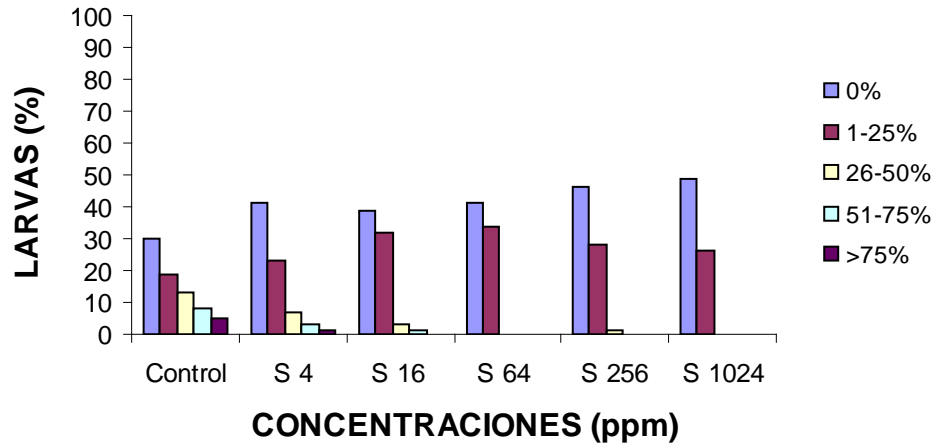


Figura 10. Porcentaje de discos de hojas comido por larvas de *Hylesia metabus* del cuarto instar a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación de Dipel®.

Vásquez (1984) observó que aparentemente, las larvas de los primeros 3 instares no son afectadas y que las implicaciones morfológicas y funcionales en la tolerancia a la infección bacteriana de las distintas fases larvales no han sido establecidos, por lo tanto, existen limitaciones conceptuales para el uso de *Bacillus* sp. A nivel de laboratorio, se ha logrado erradicar en un 100% a las larvas de este satúrnido. En fase experimental, en el campo la bacteria también causa niveles de mortalidad mayor de 80%. También menciona que, no obstante, las larvas de *H. metabus* son afectadas por la bacteria solamente a partir del cuarto instar, lo que reduce sustancialmente el tiempo efectivo de la bacteria y baja su eficiencia como agente de control (Vásquez, 1994).

Estos resultados no coinciden con los datos obtenidos en el presente trabajo, en donde se observó que las larvas del cuarto instar fueron las más resistentes

ya que éstas fueron las que presentaron un porcentaje de mortalidad más bajo. Esto hace deducir que realmente es a partir del quinto instar cuando la bacteria (Figuras 11-12) afecta a la larva de *H. metabus*.

En la figura 11 se observa que las mortalidades de las larvas del control excedieron el 5%, esto se corrigió con la fórmula de Abbott (1925). También se observan dos

grupos, en el primero están las soluciones de 4 ppm (44%), 64 ppm (54%) y 16 ppm (60%) que produjeron mortalidades similares y en el segundo grupo se encuentran a las soluciones de 256 y 1 024 ppm. Esta última concentración fue la que produjo mayor porcentaje de mortalidad, resultando ser de 92%. Es importante resaltar que en este instar, fue donde se observó un mayor porcentaje de mortalidad de las larvas en comparación con los del tercer y cuarto instares (Figura 12). Es de notar que tuvieron un comportamiento de mortalidad similar al del tercer instar, ya que la mortalidad fue incrementándose a medida que se incrementaban las concentraciones.

La figura 11 y 12 muestran la mortalidad acumulativa durante seis días posteriores a la infección de las larvas de *H. metabus* del quinto instar, tratadas con la formulación de Dipel®.

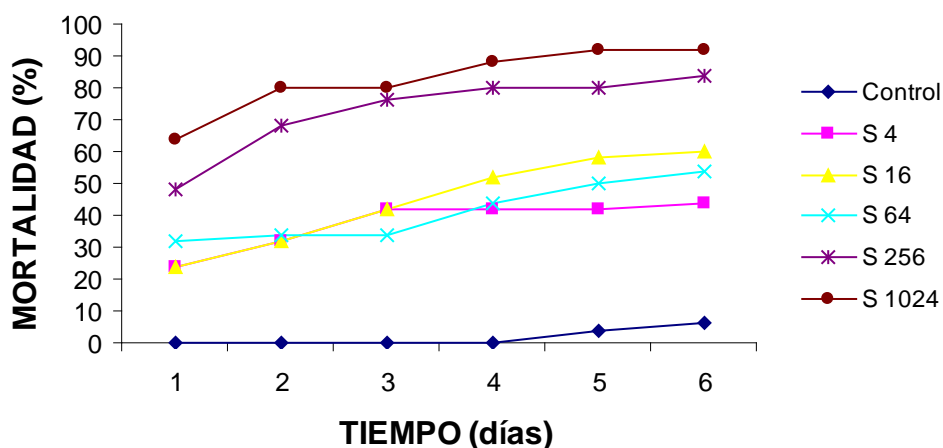


Figura 11. Mortalidad de las larvas de *Hylesia metabus* del quinto instar durante seis días tratadas con una formulación del Dipel®.

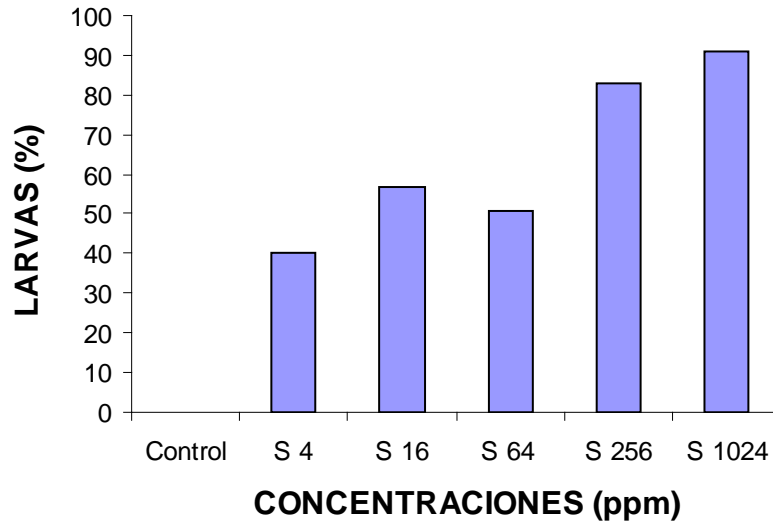


Figura 12. Frecuencia acumulada corregida, según la fórmula de Abbott (1925), de larvas de del Dipel®. *Hylesia metabus* del quinto instar muertas a los seis días después de la infección tratadas con una formulación.

La figura 13 muestra el porcentaje de discos de hojas infectadas consumido por las larvas del quinto instar luego de las primeras 24 horas después de la exposición a una formulación del Dipel®. Aquí se aprecia que las larvas del quinto instar en general consumieron una mayor porción del disco infectado en todos los tratamientos, especialmente los infectados con la menor concentración, es decir, la solución de 4 ppm, esto justifica la mayor mortalidad en las larvas de este instar. Sin embargo, las larvas de las concentraciones de 256 y 1 024 ppm fueron las que consumieron menos del disco infectado y fueron las que arrojaron un mayor porcentaje de mortalidad. Esto sugiere, que las larvas del quinto instar necesitan una menor cantidad del complejo espora cristal, el cual contiene las proteínas insecticidas que al ser ingerido por la larva le causa la muerte (Perey y Fast, 1983). Además, como se expuso anteriormente, las larvas aparentemente son afectadas por la bacteria a partir del quinto instar, por consiguiente se puede deducir que el quinto instar es el más susceptible frente al Dipel® y por lo tanto no es necesario utilizar la última concentración ya que con la de 256 ppm también se logran altos porcentajes de mortalidad.

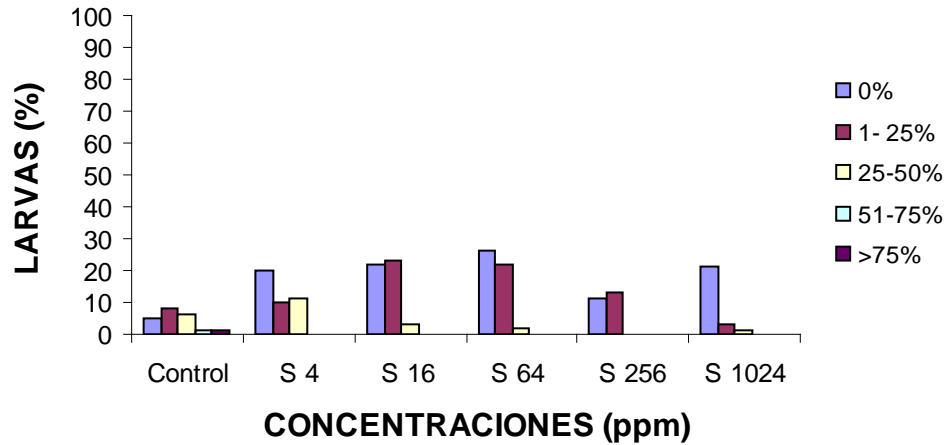


Figura 13. Porcentaje de discos de hojas comidos por las larvas de *Hylesia metabus* del quinto instar a las 24 horas después de ser tratadas con una formulación del Dipel®.

Esto pudiera deberse a la presencia de factores inmunitarios, por ejemplo: las lisozimas, las cuales son uno de los factores humorales mejor conocidos en la defensa de los insectos. En un estudio realizado con larvas sanas y tratadas de *H. metabus* del segundo, tercer y quinto instares, se midieron los niveles de lisozimas después de 6, 12 y 24 horas de la infección, obteniéndose concentraciones menores en el segundo instar, luego le sigue el quinto y por último el tercero (Motaban y cols., 2001). Las altas concentraciones de lisozimas presentes en el tercer instar, sugieren que éste pudiera ser uno de los factores, que permitió que los daños causados por la bacteria patógena fueran más leves en comparación con los otros instares. No se han estudiado las concentraciones de lisozimas presentes en las larvas del cuarto instar, sin embargo, es posible que éstas se encuentren aumentadas en este instar también (Motaban y cols., 2000).

Al comparar el comportamiento de alimentación de las larvas del tercer, cuarto y quinto instares (Figuras 7, 10 y 13), se observa que las larvas expuestas a las concentraciones de 4 ppm comían más del disco infectado, pero la mortalidad era menor. Esto pudo deberse a que la solución estaba más diluida y la cantidad de complejo espora

cristal no era suficiente para producir la muerte, en comparación con los discos de las soluciones más concentradas, pero se pudo observar en todos los instares larvales y en cada concentración, que una vez que las larvas entraban en contacto con el producto comenzaron a presentar ciertos síntomas como: decoloración, pérdida de la movilidad y secreciones por la boca y el ano.

Por otra parte, Osborn y cols. (2002) indican que una vez que las larvas entran en contacto con el producto, comienzan a presentar ciertos signos que son característicos de una infección bacteriana que son: flacidez, pérdida de la movilidad y pérdida marcada del apetito, aunque este proceso puede durar de 3 a 4 días, la larva deja de comer minutos después de haber ingerido los cristales por paralización de su aparato bucal; además, explican que cuando esto ocurre por lo general la larva deja de alimentarse, debido a una parálisis intestinal, lo que por consecuencia no permite el desarrollo larval causándole finalmente la muerte, tal como lo reportan Gueldner y cols. (1992). Es por esta razón que a mayor concentración las larvas comen menos y aumenta la mortalidad.

El análisis estadístico aplicado para determinar diferencias del consumo de hojas infectadas de las larvas de *H. metabus* (Tabla 1) revela que hubo diferencias estadísticamente significativas para los tres instares.

Tabla 1. Porcentaje de hojas infectadas consumidos por las larvas de *Hylesia metabus* del tercer, cuarto y quinto instares dependiendo de la concentración de Dipel® utilizada.

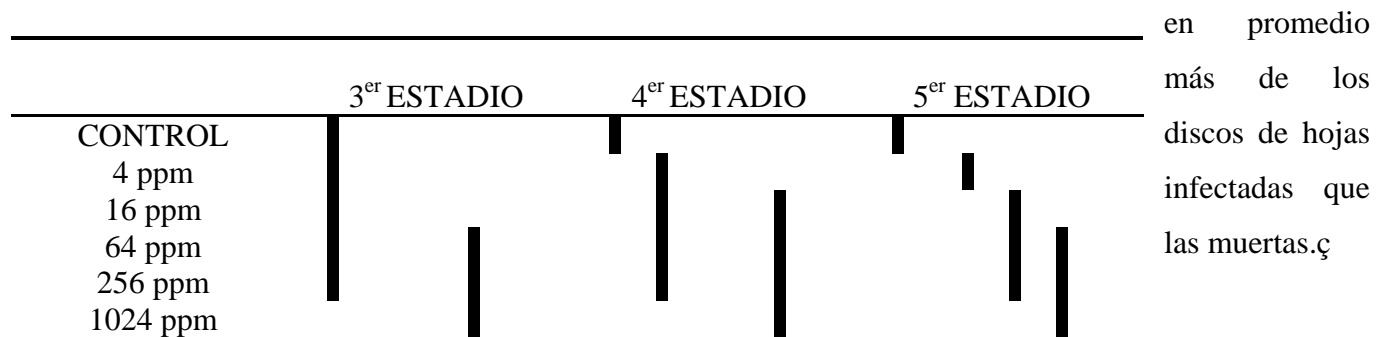
Larvas de <i>H. metabus</i>	Control	4 ppm	16 ppm	64 ppm	256 ppm	1024 ppm	F	P
3 ^{er} Estadio	7,417%	7,094%	7,333%	4,917%	3,583%	2,750%	2,742	0,019
4 ^{to} Estadio	25,917%	6,333%	10,167%	8,417%	6,250%	8,417%	12,028	<0,001
5 ^{to} Estadio	54,375%	24,375%	13,500%	11,625%	8,500%	6,000%	37,452	<0,001

En la tabla 2 se muestra la formación de grupos con promedios según la prueba “*a posteriori* de Duncan”. Esta prueba indicó la presencia de 2 grupos para las larvas del tercer instar, en donde el primer grupo está formado por el control, 4, 16, 64 y 256 ppm iguales entre ellos, es decir, se comportaron de manera similar y el segundo grupo, formado por las concentraciones de 64, 256 y 1 024 ppm, que no difieren estadísticamente. En el cuarto instar se obtuvieron tres grupos: uno formado por el control, el segundo formado por las concentraciones de 4, 16, 64, y 256 ppm las cuales tuvieron comportamientos similares y, el último, formado por 16, 64, 256 y 1 024 ppm.

Finalmente, en el quinto instar se observan 4 grupos, en el primero se encuentra el control, en el segundo se encuentra la concentración de 4 ppm, el siguiente formado por las concentraciones 16, 64 y 256 ppm y, por último, encontramos a las concentraciones de 64, 256 y 1 024 ppm.

Tabla 2. Formación de grupos según prueba “*a posteriori* de Duncan” dependiendo la concentración de Dipel® utilizada.

En la tabla 3 se observa que hubo diferencias estadísticamente significativas para el quinto instar, es decir, que solo en el caso de las larvas del quinto instar hubo relación entre el porcentaje de hoja consumido y la supervivencia. Por lo tanto, hubo una relación directamente proporcional: a mayor consumo mayor mortalidad. Además, se observó que sólo en las larvas vivas del quinto instar comieron



en promedio más de los discos de hojas infectadas que las muertas.ç

Tabla 3.

Comportamiento de alimentación de hojas infectadas dependiendo si sobreviven o no las larvas de *Hylesia metabus* al final del ensayo, para el tercer, cuarto y quinto instares.

Larvas de <i>H. metabus</i>	PROMEDIOS				
	VIVAS	MUERTAS	CONTROL	F	P
3 ^{er} Estadio	4,4	4,9	6,7	0,375	0,540
4 ^{to} Estadio	10,1	6,9	22,2	0,253	0,615

5 ^{to} Estadio	19,5	6,7	58,3	55,909	<0,001
-------------------------	------	-----	------	--------	--------

En la tabla 4 se encuentran los resultados obtenidos en el análisis del Test de Signo de los tercer, cuarto y quinto instares. Aquí se muestra que no hubo diferencia significativa alguna en las larvas del tercer instar, esto podría deberse a que éstas tuvieron tendencia a no comer ninguno de los dos discos (Figura7). Al igual, se observa que en las larvas del cuarto instar no hubo diferencia (4, 16, 256 y 1 024 ppm) o las larvas comieron más de los discos infectados (64 ppm), es decir, que esta concentración arrojó un valor estadísticamente significativo. Por último, para las larvas del quinto instar, se aprecia que la concentración de 1024 arrojó un valor estadísticamente significativo, en donde se obtuvo que las larvas las cuales tuvieron preferencia por los discos sanos, lo que indica que están seleccionando discos no infectados.

Se espera que el complejo espora cristal sea ingerido por la larva para que produjera un efecto tóxico, o fuera capaz de producir un deterioro en el desarrollo de las larvas de *H. metabus*, hasta provocar la muerte de las mismas. En la presente investigación se pudo observar que las larvas eligen no comer cuando la hoja está infectada con el larvicida Dipel®, lo cual pasaba mayormente con las larvas

que se encontraban en contacto con

	3 ^{er} ESTADIO	4 ^{to} ESTADIO	5 ^{to} ESTADIO
PENDIENTE	0,86	0,51	0,637

los discos de mayor concentración, sin embargo, se registró mortalidad de las larvas, aún comiendo menos de lo esperado del disco de hoja infectado con el producto.

Instares	4 ppm	16 ppm	64 ppm	256 ppm	1024 ppm
Tercer	0,333	0,444	0,500	0,500	0,500
Cuarto	0,378	0,078	0,034 *	0,500	0,378
Quinto	0,348	0,221	0,298	0,401	0,013 *

Tabla 4. Análisis de test de signo de los tercer, cuarto y quinto

instares de las larvas de *Hylesia metabus*

*diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$.

DESVIACIÓN STANDAR (DS)	0,09	0,10	0,14	Tabla 5. Análisis Probit para determinar la concentración mortal del 50% de las larvas de
CL ₅₀	198,32	8659,53	6,21	
LC	134,31 - 314,32	1977,75 –217351,05	1,64 – 13,86	

H. metabus del tercer, cuarto y quinto instares expuestas a diferentes concentraciones del Dipel®

CL₅₀: concentración letal 50%, DS: desviación estándar, LC: límite de confiabilidad

El análisis Probit presentado en la tabla 5, muestra que el larvicida Dipel® ofrece mayor efectividad en matar las larvas del quinto instar de *H. metabus*, ya que en éstas se logró un 40% de mortalidad con la concentración de 4 ppm, hasta alcanzar 92% de mortalidad de las mismas con la máxima concentración (1 024 ppm) (Figura 11), luego se encuentran las larvas del tercer instar con un 68% de mortalidad con la solución más concentrada (Figura 5) y, por último, se ubican las larvas del cuarto instar obteniéndose un 37% de mortalidad (Figura 8). Por consiguiente, se necesita una mayor cantidad del producto para causar la muerte de las larvas del cuarto instar en comparación con la cantidad de producto que se necesita para matar las larvas del quinto instar.

Guzmán, (2008) evaluó la efectividad del Dipel® sobre las larvas del tercer, cuarto y quinto instar en donde éstas solo tuvieron un disco infectado con Dipel®, y se obtuvieron concentraciones letales mucho menores, que en el presente trabajo, resultando ser entre 2,1 y 6,59 veces mejor. Esto sugiere que existe un efecto con respecto a la presencia de discos infectados y sanos aún cuando no se pudo comprobar que las larvas seleccionan a las hojas sanas, excepto en el quinto instar. También es importante señalar que en condiciones de campo, al hacer las aspersiones, hay que utilizar las dosis letales para las larvas más resistentes que en este caso son las larvas del cuarto instar, debido a que la dosis requerida para matar a las larvas más resistentes también va a eliminar a las larvas más susceptibles.

Cabe destacar que las larvas controles de todos los instares comieron un porcentaje mayor de los discos, que las larvas expuestas a diferentes concentraciones evaluadas, o sea, que la alimentación de las larvas está relacionada con la presencia del producto.

Lo anteriormente expuesto es sustentado por García (1991), quien evaluó el efecto de Diazinon, Deltametrina y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en el control de poblaciones larvales del gusano del repollo, *Leptophobia aripa*, utilizando un diseño en bloques al azar con cuatro repeticiones. En donde se encontró que las diferencias observadas fueron altamente significativas ($p > 0,01$), pudiéndose establecer tres grupos de valores. En primer lugar *B. thuringiensis* y la Deltametrina, que resultaron ser los mejores productos insecticidas para el control de las plagas, mientras que Diazinón mostró poco efecto en el control de las mismas. Cabe destacar que García, no trabajó con *Hylesia metabus*, sin embargo, hizo una comparación con el insecticida Dipel® y otros insecticidas sobre otra especie de lepidóptero, en donde encontró que el primero fue el más efectivo para matar al gusano del repollo.

De acuerdo a estos resultados, el larvicida Dipel®, a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* resultó ser más eficaz en matar larvas del quinto instar seguido por las larvas del tercer instar y por último larvas del cuarto instar. Esto pudiera deberse a que las larvas del quinto tuvieron mayor susceptibilidad al tratamiento, mientras que las larvas del cuarto, aunque comieron, fueron más resistentes al producto. Por lo tanto, se recomienda que se realicen estudios de resistencia al Dipel® en larvas de *H. metabus* del cuarto instar. Con respecto a la selección de los discos de hojas por parte de las larvas, las de tercer instar no tuvieron preferencia por ninguno de los dos discos, las larvas del cuarto instar a una de las concentraciones seleccionaron discos infectados y las otras cuatro restantes seleccionaron discos sanos y finalmente las larvas del quinto instar en donde se pudo comprobar la preferencia de las larvas por los discos infectados, excepto en la mayor concentración.

CONCLUSIONES

La eficacia del insecticida Dipel® depende del instar larval donde se encuentre. Las larvas del cuarto fueron las más resistentes frente al insecticida Dipel®, mientras que las del quinto instar fueron las más sensibles.

También se evidenció que al aumentar la concentración del producto se reduce la cantidad de hoja comida por las larvas.

Existe una relación entre el comportamiento alimenticio de las larvas (comer o no comer discos infectados) y la muerte de las mismas.

La susceptibilidad de las larvas es aparentemente condicionada por la presencia de hojas sanas e infectadas, aunque la capacidad selectiva de las larvas no se comprobó de manera directa.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 256-267.
- Badii, M.; Flores, A.; R. Foreughbakhch; Quiroz, H. y Torres, R. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*: 40-47.
- Boyé, C. 1932. La papillonite guyanaise. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 25: 109-110.
- Dao, L. 1966. Dermatitis por mariposas (*Hylesia*). Tribuna médica, 3(134): 1-3.
- Dinehart, S.; Jorizzo, J.; Soter, N.; Noppakun, N.; Voss, W.; Hokanson, J. y Smith, E. 1987. Evidence for histamine in the urticating hairs of *hylesia* moths. The Journal of Investigative Dermatology, 88(6): 691-693.
- Dinehart, S.; Archer, M.; Worf, J.; McGayran, M.; Reitz, C. y Smith, E. 1985. Dermatitis from contact with *Hylesia*. Academia Dermatology, 13: 734-747.
- Ducombs, G.; Lamy, M.; Michael, M.; Pradinand, R.; Janet, P.; Vicendeau, W.; Maleville, J. y Texier, L. 1983. La papillonite en Guayane Française. Etude clinique et epidemiologique. Annual Dermatology Vetereology, 110: 809-816.
- Dulmage, H.; Correa, J. y Gallegos-Morales, G. 1990. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In : Bacterial control of mosquitoes & black flies. Edit., 110-131.
- Finney, D. 1971. Probit analysis. The syndics of the Cambridge University Press, Cambridge.
- Fornés, L. y Hernández, J. 2001. Reseña histórica e incidencia en la Salud pública de *Hylesia metabus* (Crammer) (*Lepidoptera:Saturniidae*) en Venezuela. Entomotrópica, 16(2): 137-141.
- Galán, L.; García, J.; Ellis, S.; Quintero, Z. y Luna, O. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. En: Avances en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México: 139-152.
- García, J. 1991. Efecto de Diazinon, Deltametrina y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* en el control de larvas de lepidoptera en siembra de repollo. Boletín de Entomología Venezolana, 6(1): 19-25.
- Germanetto, P. 1982. Guyanese moth allergy (papillonite guyanaise) French Guiana. Caribbean Epidemiology Centre, 8(11): 1-3.
- Gueldner, R.; Snook, M.; Widstrom, N. y Wiseman, B. 1992. TLC screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall army worm and the corn earworm in *Zea mays*. Journal of Agriculture and Food Chemical, 40: 1211-1213.

Gusmao, H.; Forattini, D. y Robert, A. 1961. Dermatitis provocada por lepidópteros del género *Hylesia*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 3: 14-120.

Guzmán, T. 2008. Evaluación de la efectividad del larvicida Dipel®, a base de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* sobre las larvas de tercer, cuarto y quinto estadios de *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

Harwood, R. y James, M. 1979. Entomology in human and animal health 7^a. E. Macmillan Publishing Co., Inc. New York.

Höfte, H. y Whiteley, H. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews, 53: 242-255.

Jorg, M. 1969. Nódulo inflamatorio subcutáneo por espículas de *Hylesia fulviventris* (Lepidoptera). Boletín Chileno de Parasitología, 24: 145-150.

Karamanlidou, G.; Lambropoulos, A.; Kolais, S.; Manoisis, T.; Ellar, D. y Kastritsis, C. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Applied and Environmental Microbiology, 57: 2277-2282.

Lundberg, U.; Osborn, F.; Carvajal, Z.; Gil, A.; Gerrero, B. y Piñango, C. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una proteasa con actividad semejante a la calikreina de las posturas de *Hylesia metabus* (Crammer 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), comunicación preliminar, Revista Científica, FCV-LUZ, 12(2): 97-102.

Maagd, R.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N. y Schnepf, H. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annual Review of Genetics, 37: 409-33.

Macias, L. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* una Alternativa para el control Biológico de Mosquitos. Tesis de Licenciatura. Laboratorio de Ecología Microbiana del IIQB. Facultad de Biología/UMSNH. Ciudad Universitaria Morelia, Mich.

Martínez, J. 1986. Informe sobre invasión de mariposas alergizantes. Hospital Centro de Salud Irapa.

Motabán, L.; Osborn, F. y Nusetti, O. 2000. Actividad lisozimica y fagocitica en larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturnidae) sanas e infectadas con una bacteria patógena. Acta Científica, 51(2): 147.

Osborn, F.; Berlioz, L.; Vitelli, J.; Monsalve, W.; Dorta, B. y Rodriguez, V. 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). Journal of Invertebrate Pathology, 80: 7-12.

Osborn, F.; Motaban, L. y Gutierrez, J. 2001. Crecimiento y supervivencias de larvas de *Hylesia metabus* (Crammer) (Lepidoptera: Saturniidae) alimentadas con cuatro diferentes plantas hospederas.

Saber, 13(1): 14-22.

Osborn, F. 2002. Primer reporte de un microsporidio parasítico en larvas de *Hylesia metabus* Crammer, 1775 (Lepidoptera: Saturniidae), Entomotrópica, 17(2):185-188.

Perey, J y Fast, P. 1983. *Bacillus thuringiensis* cristal toxin: Ultrastructural Studies of its effect on silkworm midgut cells. Journal of Invertebrate Pathology, 41: 86-98.

Pesce, H. y Tejada, A. 1969. Epidemiología y aspectos clínicos del lepidopterismo en el Perú. Boletín Chileno de Parasitología, 24: 130-133.

Pinto, C.; Rosales, B. y Peralta, R. 1992. Dermatitis caused by Moths of *Hylesia* Genus (Lepidoptera: Saturniidae) in Northeastern States of Venezuela: II. Biochemistry and Immunoallergy of Substances Responsible for Dermal Lesions. 1992. American Journal of Contact Dermatitis, 3(1): 5-15.

Reitz, C. y Smith, E. B. 1985. Dermatitis from contact with *Hylesia*. Academia Dermatology, 13: 734-747.

Schnepf, E. y H.R. Whiteley 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. Journal of Biological Chemistry, 260: 6273.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 775-806.

Siegel, S y Castellan NJ. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences London, New York: McGraw-Hill.

Vásquez, L. 1990. Estudio biológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* (Crammer) en el Oriente de Venezuela. Saber, 3(1): 14-20.

Vásquez, L. y Olivares, M. 1984. La palometa *Hylesia* (*Hylesia sp*) un problema ecológico en la región Oriental de Venezuela. IX Congreso Venezolano de Entomología. Libro de resúmenes, resumen n° 39, San Cristóbal Venezuela, Julio.

Vásquez, L. 1994. Estudio bioecológico y estrategias de control de la palometa *Hylesia metabus* (Crammer) (Lepidoptera: Saturniidae) en la región oriental. Periodo 1985-1987 y 1991-1993. Informe del consejo de investigación, Universidad de Oriente, Venezuela.

Vassal, J. 1985. Programme d'étude de la biologie et de l'écologie de l'agent de la papillomite en Guyane Française, en vue de la mise en place d'une structure de lutte intégrée. Rapport d'activité MARS- Septembre. Institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM) (Mimeografiado).

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	EFFECTOS DE SELECCIÓN ENTRE HOJAS SANAS E INFECTADAS CON UN LARVICIDA A BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> Y SU EFICIENCIA COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LAS LARVAS DE <i>Hylesia metabus</i> CRAMER (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) (Modalidad: Investigación)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Muñoz Díaz Finordys de los Ángeles	CVLAC
e-mail		finord@hotmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Hylesia</i>
Dipel
Palometa
Control biológico
<i>B. thuringiensis</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Hylesia metabus es una polilla, la cual posee setas urticantes que causan dermatitis severa en humanos. Aunque se conoce que se alimenta de diversas plantas, las hospederas principales son *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, lo que ha restringido su distribución en la región nor-oriental de Venezuela a las zonas de manglar. Se evaluaron los efectos de selección de hojas sanas e infectadas con el larvicida Dipel®, y su efecto como controlador biológico de las larvas de *Hylesia metabus*. Se colectaron larvas de segundo, tercero y cuarto instar en Caño de Ajíes, municipio Benítez, y se trasladaron al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO) en cavas de aníme, dentro de las cuales se colocaron hojas frescas de *L. racemosa*. Se prepararon las diferentes soluciones del larvicida Dipel® a 4, 16, 64, 256 y 1 024 ppm. Se estudiaron 125 larvas para cada instar y se realizaron 3 réplicas para los tercer y cuarto instares y 2 réplicas para el quinto instar. Las larvas fueron expuestas a soluciones de diferentes concentraciones para observar el comportamiento de éstas frente al insecticida. Los resultados de consumo de discos de hojas expuestas a distintas concentraciones de Dipel® para los tres instares mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se observó la formación de dos grupos de promedios para las larvas del tercer instar, con el control siendo diferente a la concentración de 1 024 ppm, tres grupos para las larvas del cuarto instar y cuatro grupos para las larvas del quinto instar, con el control diferente a los de las concentraciones de Dipel®. Además, se evidenció que no hubo preferencias de alimentación ($p > 0,05$) entre los discos sanos e infectados para las larvas del tercer instar, mientras que para las del cuarto instar, en general, se observó una disminución del consumo de hojas a mayores concentraciones y las del quinto instar tuvieron preferencia por los discos sanos. En conclusión, se evidenció que al aumentar la concentración del producto se reduce la cantidad de hoja comida por las larvas, además que la eficacia del insecticida Dipel® es afectado por la edad de las larvas y resultó ser más eficaz en matar larvas del quinto instar seguido por las larvas del tercer instar y por último larvas del cuarto instar.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marcos De Donato	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	7.259.865
	e-mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e-mail	
Sandra Díaz	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.947.336
	e-mail	andreinacumana@yahoo.es
	e-mail	
Isabel Mimbela De Loroño	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	15.575.530
	e-mail	isaloroño@cantv.net
	e-mail	
Melfran Herrera	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.455.513
	e-mail	melfranh@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	02	12

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_FM.doc	Aplicattion/word

Alcance:

Espacial : universal (Opcional)

Temporal: intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio:

Bioanálisis

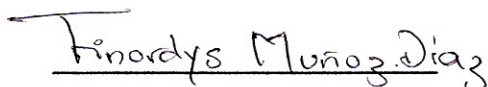
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

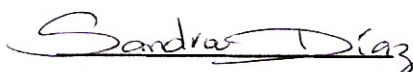
Se garantiza a la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre el derecho a archivar y difundir sólo el título y resumen de este trabajo. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos.



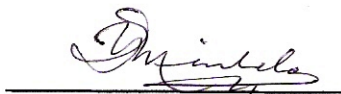
Finordys Muñoz
AUTOR 1



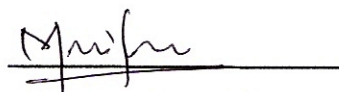
Dr. Marcos De Donato
TUTOR



LIC. Sandra Díaz
Coasesora



Prof. Isabel Mimbela
JURADO 1



Prof. Melfran Herrera
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

