

EFEECTO DEL ALMACENAMIENTO A BAJAS TEMPERATURAS DE HUEVOS DE *Oxydia trychiata* (GUENEE) SIN PARASITAR Y PARASITADOS POR *Telenomus alsophilae* VIERECK

Gonzalo A. Mejía M.
y Alex E. Bustillo P.¹

1. RESUMEN

El almacenamiento de huevos no parasitados y parasitados a bajas temperaturas se realiza para interrumpir el desarrollo, bien sea del huésped o del parásito, con el fin de sincronizar labores de crías masivas y/o de liberaciones de parasitoides en el campo.

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) Estudiar el efecto del almacenamiento a -6.76°C de huevos de *Oxydia trychiata* (Guenée) sin parasitar, guardados en bolsas plásticas a las cuales se les succionó el aire ("vacío") y en frascos de vidrio tapados herméticamente. Los huevos se mantuvieron bajo congelación durante un número variable de días (15, 30, 45, 60, 80 y 100) antes de exponerlos al parásito *Telenomus alsophilae* Viereck. 2) Estudiar el almacenamiento, bajo condiciones de congelamiento (-6.76°C), de huevos de *O. trychiata* parasitados por *T. alsophilae* en diversas edades de desarrollo del parasitoide (1, 2, 3, 4, 7, 15, 20 y 23 días), los cuales se mantuvieron en bolsas plásticas al vacío durante 15 días. También, en huevos de 23 días de parasitados, se observó el efecto de esta congelación durante 15, 30 y 45 días. 3) Observar el efecto del enfriamiento a 4.15°C de huevos de 23 días de parasitados almacenados en un desecador de cristal (70%HR) durante 15, 30 y 45 días. Todos los experimentos se arreglaron en un di-

seño completamente al azar con cuatro repeticiones. El ensayo de los huevos sin parasitar tuvo un arreglo factorial 2×6 .

El deterioro de algunas posturas sin parasitar, almacenadas a -6.76°C , se manifestó por la contracción del corión, porque algunos huevos presentaron una sustancia grumosa y por el cambio de color de amarillo a pardo, durante y después del congelamiento. Estos daños fueron más frecuentes en las posturas almacenadas en frascos herméticos, especialmente después de los 45 días de congelación. El parasitoide, sólo, se desarrolló en los huevos que conservaron su color natural y consistencia.

Los datos registrados fueron: parasitismo total, parásitos emergidos y no emergidos y aquéllos que murieron en el estado de larva. A excepción de la no emergencia, ($P < 0.01$), entre los tratamientos de los huevos con congelamiento previo a la acción parasítica en los diversos estados en que se dividió el parasitismo se presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$). El parasitismo total varió en 91,85% a los 15 días a 20,22% a los 100 días; para la emergencia, de 74,51% a 16,48% a los 15 y 100 días, respectivamente; para la no emergencia, entre 19,80% para 30 días y 3,74% para 100 días y en los huevos en que el parásito sólo se desarrolló hasta larva de 8,15% (15 días) a 79,78% (100 días). En general, el parasitismo disminuyó a medida que se incrementó el tiempo y los análisis de regresión fueron altamente significativos ($P < 0.01$) y mostraron tendencias lineales para todos los estados de desarrollo del parásito y sólo fue ascendente para los huevos de *O. trychiata* en donde *T. Alsophilae* murió en estado de larva. La

relación sexual de los parasitoides emergidos y no emergidos favoreció siempre las hembras y no fue afectada significativamente por tratamientos.

En cuanto a los huevos de *O. trychiata* parasitados y almacenados en un congelador, se encontró que los estados inmaduros de *T. alsophilae* ensayados son altamente susceptibles al congelamiento (-6.76°C), ya que ningún adulto emergió. Cuando los huevos parasitados de 23 días de desarrollo se sometieron a enfriamiento a 4.15°C , sólo emergieron parasitoides (25,62%) machos en el tratamiento de 15 días (25,62%).

Los resultados de este estudio permiten concluir que es factible someter a congelamiento huevos de *O. trychiata* para someterlos, posteriormente, al parasitismo de *T. alsophilae* y el método de almacenamiento en boses plásticas es más eficiente y económico. El congelamiento se debería ensayar con otras especies de insectos, para los cuales se requiera establecer crías masivas de parásitos de huevos.

Palabras claves adicionales: Control biológico, parásito de huevos, crías de insectos, congelamiento de huevos, insectos forestales.

2. SUMMARY

EFFECT OF STORING AT LOW TEMPERATURES *Oxydia trychiata* (Guenée) EGGS UNPARASITIZED AND PARASITIZED BY *Telenomus alsophilae* VIERECK

Storing insect eggs at low temperatures for use in rearing egg parasites is done to interrupt the insect development

¹ Respectivamente, Ingeniero Agrónomo Apartado Aéreo 4222 e Ingeniero Agrónomo Ph.D. Estación Experimental "Tulio Ospina", ICA. Apartado Aéreo 51764 Medellín, Colombia. Contribución de la Sección de Entomología del ICA.

and, when parasitized, to stop the parasitoid development. This technique facilitates synchronization of insect rearing and field parasite releases. The objectives of this research were: 1) to study the effect of cold storage (-6.76°C) on unparasitized *Oxydia trychiata* eggs placed in double plastic bags, the air was removed from each bag, and the necks of the bags were twisted and tied. Eggs were also stored in glass containers tightly sealed. Eggs were maintained under freezing during a variable number of days (15, 30, 45, 60, 80 and 100) before being exposed to *Telenomus alsophilae*. 2) to study the effect of cold storage (-6.76°C) on parasitized *O. trychiata* eggs with different development ages of parasitization (1, 2, 3, 4, 7, 15, 20 and 23 days); these eggs were kept in plastic bags during 15 days in a freezer. Also 23-days old immature parasitoids were tested using different freezing times (15, 30 and 45 days). Another experiment was conducted to find out the effect of refrigeration conditions (4.15°C) using 23-days old parasitized eggs stored in a dessicator (70%RH) during 15, 30 and 45 days. All the experiments were set up in a complete randomized design with four replications. The experiment with unparasitized eggs was set up in a factorial array 2 x 6.

The deleterious effect of cold storage (-6.76°C) on the unparasitized eggs was manifested by the shrinking of eggs, granules inside the eggs and the change in color from yellow to brown. These signs were more frequent in eggs stored in glass containers than those stored in plastic bags, specially after 45 days of cold treatment. Parasitoids developed only in eggs that remained normal in appearance.

Data recorded were total parasitism, emerged parasites, unemerged parasites and those that died in the larval stage. With the exception of the unemerged category there were significant differences ($P < 0.01$) among treatments when unparasitized eggs were exposed to cold storage. Total parasitism varied from 91.85% at 15 days to 20.22 at 100 days. The emerged parasites varied from 74.51% to 16.48% for the same days; the unemerged-parasite

category varied from 19.8% at 30 days to 3.74% at 100 days and for those eggs where the parasite died in the larval stage varied from 8.15% at 15 days to 79.78% at 100 days. In general parasitism decreased as storing time increased, a regression analysis showed a linear trend for all the categories. The *T. alsophilae* sex ratio favored females and was not significantly affected by the treatments.

Parasitized eggs of *O. trychiata* were highly susceptible to cold treatment in the freezer (-6.76°C) and in the refrigerator (4.15°C). None emerged from those stored in the freezer but when stored in the refrigerator only a proportion (25.62%) of immature parasites emerged as males in the 15-day cold treatment.

Results of this study indicate that *O. trychiata* eggs can be stored at -6.76°C for long period of time (one to two months) and remain viable for *T. alsophilae* development. The storage method using double plastic bags is more efficient and economic. Cold treatments should be tested against other insect species which need to be used for egg parasite rearings.

Additional index words: Biological control, eggs parasites, insect rearing, egg freezing, forest insects.

3. INTRODUCCION

Oxydia trychiata (Guenée) (Geometridae) es un defoliador de coníferas en Colombia, que causa severos daños en bosques de pino pátula y ciprés. El control de este insecto es bastante difícil, por la limitación en el uso de insecticidas los cuales producen un desequilibrio biológico, riesgos de contaminación, son difíciles de aplicar y, además, son relativamente costosos. Por lo tanto, el manejo de sus poblaciones se enfoca a preservar la fauna benéfica y al uso del control biológico. Actualmente, esta plaga se ha mantenido regulada, en parte, con la introducción y adaptación del parasitoide de huevos *Telenomus alsophilae* Viereck (Scelionidae). La ventaja de estos parasitoides es que destruyen la plaga antes que haga daño.

Estos programas de control biológico requieren el mantenimiento de colonias de parasitoides, con el fin de liberarlos periódicamente en el campo. En Colombia, la cría de *T. alsophilae*, a menudo, se ve limitada por la falta de huevos de su huésped *O. trychiata*. Una forma de remediar esta situación puede ser el almacenamiento a bajas temperaturas de estos huevos, para detener su desarrollo y sincronizar las labores de cría. El enfriamiento puede, además, inducir a que ciertos parasitoides ataquen huéspedes que normalmente no atacan. En algunos casos, es deseable, también, almacenar a bajas temperaturas huevos parasitados con distintas edades de desarrollo.

La detención en el desarrollo de los huevos, mediante enfriamiento, puede, además, ser un método ventajoso en programas de control biológico en que se requiera el envío de huevos parasitados bajo cuarentena y que de aquellos no parasitados no emerja el insecto plaga.

El propósito de este estudio fue el de determinar el efecto de bajas temperaturas sobre huevos de *O. trychiata* sin parasitar y parasitados por *T. alsophilae*, con el fin de hacer más eficiente la cría masiva y el mantenimiento de las colonias de este importante parasitoide. También, comparar dos métodos de almacenamiento de los huevos, usando bolsas plásticas a las cuales se les extrae el aire y frascos de vidrio tapados herméticamente.

4. REVISION DE LITERATURA

El parasitoide de huevos *T. alsophilae* es el factor más importante de control natural, para regular las poblaciones del geometrido *Alsophila pomataria* (Harris), defoliador de bosques moderables en Norteamérica (Furniss y Carolin 1977, Fedde et al. 1973). Este parasitoide es de gran valor en programas de control biológico, ya que se ha demostrado que posee un amplio rango de huéspedes Fedde (1977), en un ensayo de laboratorio, encontró que de 22 especies de lepidópteros, *T. alsophilae* se desarrolló normalmente en huevos de 12 especies de geometridos y en dos de noctuidos.

Telenomus alsophilae se introdujo a Colombia en 1975 para ensayarlo contra *O. trychiata*. El parasitoide se desarrolló en los huevos de este geometrido y se logró criarlo masivamente para liberarlo en una plantación de 230 ha. de pino pátula, en donde controló un brote. (Bustillo y Drooz 1977, 1978; Drooz et al. 1977). Desde esa época, se han mantenido colonias de *T. alsophilae*, siguiendo procedimientos esbozados por Bustillo y Drooz (1979), para liberarlo en las zonas donde se requiere el control de *O. trychiata*. Sin embargo, el suministro continuo de huevos ha sido uno de los mayores limitantes.

En entomología se ha evaluado muy poco el efecto del enfriamiento de insectos huéspedes y, también, de sus parásitos. Los estudios han sido orientados principalmente a aspectos fisiológicos y de diapausa (Andrewartha y Birch 1974; Wigglesworth 1972). Sólo algunos himenópteros, con posibilidades de utilizarlos en programas de control biológico, han recibido alguna atención. Los parásitos de huevos más investigados pertenecen a géneros de las familias Encyrtidae, Scelionidae y Trichogrammatidae.

El almacenamiento a temperaturas inferiores a 0°C se ha hecho para mantener colonias del parásito de huevos *Oocyrtus ennomophagus* Yoshimoto (Encyrtidae) en huevos de *Eutrapela elementaria* (J.E. Smith) (Geometridae), *Lambdina pellucidaria* (Grote y Robinson) (Geometridae) y *Clostera inclusa* (Hubner) (Notodontidae) (Drooz y Solomon 1980, 1984; Drooz y Weems 1982; Drooz 1981). Este encírtido sólo ataca y se desarrolla en huevos no embrionados de su huésped *E. clemataria* (Drooz y Solomon 1980). Sin embargo, aunque *O. ennomophagus* sólo se desarrolla en huevos no embrionados, se encontró que, también, puede desarrollarse en huevos de *E. clemataria* que han iniciado la embriogénesis y al parasitismo (Drooz y Weems 1982). Igualmente, los huevos de *L. pellucidaria* que, en condiciones naturales, no son atacados por *O. ennomophagus*, cuando se los somete a congelamiento (-10°C) son parasitados debido, probablemente, a que ocurre un detenimiento en algún cambio fi-

siológico el cual inicialmente no permitía el desarrollo del parásito (Drooz 1981).

El tiempo de almacenamiento a temperaturas de congelación afecta la viabilidad de los huevos para que se desarrollen los parásitos. Drooz y Solomon (1984) encontraron que huevos de *C. inclusa*, almacenados a -10°C en bolsas dobles de plástico a las cuales se les succionó el aire, permanecieron viables para *O. ennomophagus* hasta 24 meses después de iniciado el tratamiento. Sin embargo, su viabilidad declinó notoriamente con el transcurso del tiempo.

En el interior de congeladores y refrigeradores, la humedad relativa es baja y deshidrata los huevos que allí se almacenan. La dureza del corión y el tamaño de los huevos interviene en este proceso. Landeuer, citado por Drooz y Schreuder (1972) menciona que en la incubación los huevos pequeños pierden de peso más rápidamente en agua que en los huevos grandes, porque estos tienen mayor volumen y relativamente, menor superficie de exposición. Además, el vacío creado dentro de bolsas plásticas evita el contacto del aire seco de refrigeradores y congeladores con el corión de los huevos. Este método se considera sencillo, viable, económico y con cierta seguridad para evitar deshidratación y deformación de huevos de diferentes insectos (Drooz 1981; Drooz y Barham 1985; Drooz y Solomon 1980, 1984; Drooz y Weems 1982)

Otra manera como se protegen los insectos de la desecación provocada por el congelamiento es mediante sustancias contenidas intra y extracelularmente, como el glicerol, que dan resistencia y protección contra el daño causado por las bajas temperaturas (Wigglesworth 1972) Esto podría aprovecharse conjuntamente, al usar recipientes adecuados para conservar, durante la congelación la viabilidad de los huevos utilizados en las crías masivas de parásitos.

El grado de resistencia a bajas temperaturas es característico de cada especie en particular (Andrewartha y Birch 1974); ésto se debe tener presente en

la conservación de huevos para parasitismo. A temperaturas muy bajas se ha logrado preservarlos por mayor tiempo, Gendusco (1978), al buscar la posibilidad de almacenar durante largo tiempo huevos de hemípteros poco prolíficos para reproducir algunas especies del parásito *Gryon* spp. (Scelionidae), logró conservarlos viables hasta por tres años, cuando los almacenó con nitrógeno líquido (-196°C) Gennadiev y Khlistcvsky (1980) lograron con este enfriamiento conservar hasta por cinco años huevos de insectos para la cría de parásitos. Mejía y Vélez (1983b), en la cría de *Gryon* spp. en huevos de *Leptoglossus* sp. (Coreidae), encontraron que el congelamiento a -150°C con nitrógeno líquido deterioró menor número de huevos de la chinche que el realizado a 0°C en frascos herméticos. Sin embargo, el nitrógeno líquido no es fácil de manejar y es costoso y de difícil consecución en la mayoría de los laboratorios (Drooz y Solomon 1984).

Algunos parásitos no se desarrollan en huevos cuyo embrión muere a causa del congelamiento. Egwuatu y Taylor (1977) encontraron que *Gryon gnidus* (Nixon) no parasitó los huevos de *Acanthomia tomentosicollis* (Stal) (Coreidae) muertos por congelación a -4°C, pero en los huevos no congelados se desarrolló el parásito normalmente. Sin embargo, Mejía y Vélez (1983a, 1983b) comprobaron que dos especies de *Gryon* no requerían de embriones vivos para su desarrollo. Ellos almacenaron los huevos de *Leptoglossus* sp. a 0°C durante siete días en un congelador de nevera dentro de frascos herméticos y a -150°C con nitrógeno líquido durante 4 días obteniendo un desarrollo normal de los parásitos.

Otro aspecto para estudiar con los enfriamientos es el almacenamiento a bajas temperaturas de los huevos parasitados. Algunos parásitos de huevos son afectados por los enfriamientos hechos para su conservación. Esto debido a que el desarrollo de los organismos vivos depende de la temperatura, tiempo y condiciones a las que se han mantenido durante su desarrollo (Andrewartha y Birch 1974; Bustillo y Drooz 1979; Drooz y Schreuder 1972;

Herrera 1959; Ruiz y García 1977; Yergan 1980). Aspectos reproductivos, relación de sexos, longevidad, movilidad, eficiencia y deformaciones de adultos son alterados e inducidos por los almacenamientos a bajas temperaturas de huevos parasitados (Andrewartha y Birch 1974; Herrera 1959; Ruiz y García 1977; Saldarriaga y Bustillo 1975). Mejía y Vélez (1983b), al enfriar (5°C) durante cinco días huevos de *Leptoglossus* sp. parasitados por *Gryon* spp., lograron detener el desarrollo del parásito sin afectar la emergencia, relación de sexos y apariencia del parásito. El ciclo de vida continuó su desarrollo normalmente una vez que se expusieron al ambiente.

5. MATERIALES Y METODOS

Los especímenes de *O. trychiata* utilizados en este estudio fueron colectados en estado de pupa en una plantación de pino pátula localizada en La Ceja (Antioquia), en donde se estaba desarrollando un brote de la plaga. Las pupas se llevaron a un insectario de campo (19.3°C, 90% HR) en la Estación Experimental "Tulio Ospina" del ICA, en donde se confinaron en jaulas de marcos de madera con anejo para la emergencia de los adultos. Posteriormente, machos y hembras en igual relación se confinaron en jaulas más pequeñas de 7000 cc para la oviposición. Las masas de huevos seleccionadas para el enfriamiento fueron aquellas compactas y con una sola capa de huevos.

Los adultos de *T. alsophilae* se obtuvieron de una colonia mantenida en Manizales, usando huevos del defoliador del cerezo *Oxydia olivata* (Dognin). El parásito se mantuvo en el laboratorio en frascos de vidrio de 200 cc tapados con una tela, la cual se impregnó con una solución de miel de abejas al 60%. Los huevos de *O. trychiata* y de los parásitos adultos de *T. alsophilae* así obtenidos se utilizaron para los diversos ensayos de enfriamiento, usando huevos sin parasitar y parasitados.

5.1. Congelamiento de Huevos de *O. trychiata* No Parasitados.

La congelación de las masas de huevos

se llevó a cabo en un congelador de nevera (-6.76 ± 1.04°C). Los huevos usados tenían menos de 24 horas de haber sido ovipositados. El almacenamiento se hizo en dos formas: 1) usando bolsas dobles de plástico a las cuales se les succionó el aire oralmente para crear un vacío y cerrando su parte superior con un alambre y 2) utilizando frascos pequeños de vidrio tapados herméticamente.

Las masas de huevos se mantuvieron bajo estas condiciones durante un número variable de días (15, 30, 45, 60, 80 y 100) y, al cabo de estos días, se sacaron al ambiente cuatro masas de huevos de cada método de almacenamiento y se sometieron al parasitismo por *T. alsophilae* permaneciendo el tiempo necesario para obtener que todos fuesen parasitados.

Las posturas se seleccionaron antes del parasitismo y sólo se usaron en el experimento aquéllas que conservaron la apariencia normal dentro de las bolsas y frascos durante el congelamiento.

El ensayo se organizó en un diseño experimental completamente al azar con dos métodos de almacenamiento, seis tratamientos y cuatro repeticiones en un arreglo factorial de 2 x 6. Los datos registrados fueron: número total de huevos por tratamiento, número de parásitos emergidos, número de parásitos no emergidos (parásito desarrollado hasta pupa), número de huevos donde no se desarrolló el parasitoide y la relación de sexos. El sexo de estos insectos se diferencia fácilmente por la morfología de las antenas (Masner 1976).

Los datos sobre parasitismo, en porcentaje del número total de huevos, fueron normalizados para el análisis usando la transformación $\text{Sen}^{-1} \sqrt{n/100}$. Los datos se correlacionaron a través de análisis de regresión. Además, se hicieron observaciones sobre la apariencia externa e interna de los huevos sometidos a congelamiento.

5.2. Congelamiento de Huevos de *O. trychiata* Parasitados y Almacenados en Bolsas Plásticas.

Este ensayo sólo se hizo en bolsas

plásticas dobles al "vacío", usando distintas edades de desarrollo del *T. alsophilae* dentro del huevo (1, 2, 3, 4, 7, 15, 20 y 23 días) antes de someterlos al congelamiento. Una vez transcurridos estos tiempos, los huevos parasitados a condiciones de laboratorio se confinaron en las bolsas de plástico en el congelador (-6.76°C) durante 15 días. Los huevos parasitados con 23 días de desarrollo del *T. alsophilae* fueron los únicos que se evaluaron, almacenándolos durante 15, 30 y 45 días en el congelador.

El diseño experimental utilizado para el ensayo con diversas edades de desarrollo fue completamente al azar, con 8 tratamientos y 4 repeticiones y, también, completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones, para el experimento en que sólo se evaluaron los huevos con 23 días de parasitismo.

5.3. Refrigeración de Huevos de *O. trychiata* Parasitados.

Huevos de *O. trychiata* que llevaban 23 días de haber sido parasitados (próximos a emerger el adulto) fueron sometidos a enfriamiento en una nevera a 4.15 ± 0.72°C durante 15, 30 y 45 días. El almacenamiento de éstos se realizó en un desecador de cristal, con una humedad aproximada del 70% y sin usar recipiente alguno o bolsa para proteger los huevos. El ensayo estuvo conformado con tres tratamientos y cuatro repeticiones, en un diseño completamente al azar.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Congelamiento de Huevos de *O. trychiata* no Parasitados.

Algunas de las posturas sin parasitar, almacenadas en frascos herméticos y bolsas plásticas al "vacío" presentaron huevos que se contraían durante el congelamiento (-6.76°C), posiblemente, a causa de la infertilidad, debilidad física o consistencia de los coriones. Otras se tornaron total o parcialmente pardas dentro de las bolsas y frascos. Posturas con estos daños no fueron expuestas a los parásitos.

Otras posturas conservaron su color amarillo, pero, al sacarlas al ambiente

para que fueran parasitadas, a las pocas horas de descongelamiento, se tornaron parcialmente o por completo pardas. En todas éstas se observó acción parasítica, pero no se desarrolló el parásito, posiblemente, porque la composición, que normalmente tienen los huevos en el interior, es alterada por el congelamiento, lo cual se manifiesta con el pardeamiento y la presencia dentro de los huevos de una sustancia grumosa diferente a la normal.

La presencia de grumos y pardeamiento se manifestó en los tratamientos con más de 45 días de congelación y en el almacenamiento en frascos herméticos, donde se observó un mayor número no cuantificado de huevos deteriorados. Sólo en los huevos amarillos que conservaron su color natural y consistencia se desarrolló el parasitoide.

Entre las causas que pudieron intervenir en la viabilidad de los huevos pre-congelados para el desarrollo posterior del parasitoide *T. alsophilae* y en la

resistencia de las posturas al congelamiento a través del tiempo y forma de almacenamiento, se podrían considerar el vigor del insecto, la edad, el tipo de alimentación y las condiciones de desarrollo y confinamiento de *O. trychiata*. La diferencia entre y dentro de las posturas con igual tiempo y modo de almacenamiento se manifiesta por los altos coeficientes de variación obtenidos en el experimento en todos los parámetros analizados (Tablas 1 y 2), lo cual demuestra una alta variabilidad biológica.

No se encontraron diferencias significativas entre las dos formas de almacenamiento (Tabla 1). Por lo tanto, los datos para el análisis se agruparon sin tener en cuenta estos dos métodos de almacenamiento (Tabla 2). Esto se debió, probablemente, a la selección de las posturas antes del parasitismo, lo cual fue favorable para el almacenamiento en frascos herméticos, puesto que este método presentó un número mayor de huevos deteriorados durante el congelamiento y, a pesar de ello, se

observó un parasitismo superior en los huevos almacenados en bolsas plásticas (Tabla 1).

El parasitismo total lo constituyó el número de huevos en los cuales se desarrolló el parasitoide, teniendo en cuenta, tanto los que emergieron y como los que murieron en estado inmaduro (pupas). Entre los diversos tratamientos hubo diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) y, en la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación resultó negativo y altamente significativo ($r = -0.9853$)** (Tabla 3), lo cual indica que existió una disminución del parasitismo a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento, pues, a los 15 días, el parasitismo total fue de 91.85% y disminuyó hasta 20.22% al cabo de 100 días (Tabla 2).

En relación con la emergencia de adultos de *T. alsophilae*, los datos guardaron similitud con los obtenidos para el parasitismo total, ya que a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento

TABLA 1. Número (N), porcentaje (%) y relación de sexos (RS) de huevos de *Oxydia trychiata* parasitados por *Teleonomus alsophilae*. Huevos sometidos a dos tipos de almacenamiento en bolsas plásticas al "vacío" y frascos herméticos en un congelador a -6.76°C durante un número variable de días.

Días de congelamiento	Forma de almacenamiento	Total de huevos		Huevos parásito desarrollado		Huevos parásito no emergido			Huevos parásito emergido			Total huevos parasitados	
		N	%	N	%	N	%	RS	N	%	RS	N	%
15	Bolsas	597		44	7.37	131	21.94	0.596	422	70.69	0.673	553	92.63
	Frascos	372		35	9.41	37	9.95	0.506	300	80.65	0.649	337	90.59
30	Bolsas	574		63	10.98	116	20.21	0.672	395	68.82	0.732	511	89.02
	Frascos	608		127	20.89	118	19.41	0.619	363	59.70	0.745	481	79.11
45	Bolsas	391		108	27.62	44	11.25	0.536	239	61.13	0.723	283	72.38
	Frascos	474		229	48.31	48	10.13	0.516	197	41.56	0.751	245	51.69
60	Bolsas	361		33	9.14	23	6.37	0.280	305	84.49	0.745	328	98.86
	Frascos	317		202	63.72	34	10.73	0.443	81	25.55	0.556	115	36.28
80	Bolsas	336		203	60.42	49	14.58	0.344	84	25.00	0.857	133	39.58
	Frascos	524		272	51.91	63	12.02	0.477	189	36.07	0.634	252	48.09
100	Bolsas	200		139	69.50	7	3.50	0.354	54	27.00	0.486	61	30.50
	Frascos	255		224	87.84	10	3.92	0.313	21	8.24	0.472	31	12.16
Coeficientes de variación	Bolsas				61.92		71.02	63.35		40.65	37.52		36.59
	Frascos				53.61		58.43	57.49		48.73	44.96		51.35

TABLA 2. Número (N), porcentaje (%) y relación de sexos (RS) de huevos de *Oxydia trychiata* parasitados por *Telenomus alsophilae*. Huevos mantenidos en un congelador a -6.76°C durante un número variable de días. Los datos corresponden al agrupamiento de los tratamientos de bolsas plásticas al "vacío" y de frascos herméticos.

Días de congelamiento	Total de huevos		Huevos parásito no desarrollado			Huevos parásito no emergido			Huevos parásito emergido			Total huevos parasitados								
	N	N	N	%**	RS*	N	%*	RS*	N	%**	RS*	N	%**							
15	969	79	8.15	a1)	168	17.34	a1)	0.601	722	74.51	a1)	890	91.85	a1)						
30	1182	190	16.07	a	234	19.80	a	0.594	758	64.13	a	992	83.93	a						
45	865	337	38.96	ab	92	10.64	a	0.663	436	50.40	ab	528	61.04	ab						
60	678	235	34.66	ab	57	8.41	a	0.509	386	56.93	ab	443	65.34	ab						
80	860	475	55.23	ab	112	13.02	a	0.500	273	31.75	ab	385	44.77	ab						
100	455	363	79.78	b	17	3.74	a	0.706	75	16.48	b	92	20.22	b						
Coeficientes de variación			57.31			65.11			60.52			45.82			41.06			43.30		

1) Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan al nivel del 1% (**) y del 5% (*).

TABLA 3. Parámetros obtenidos mediante un análisis de regresión ($Y = a + bx$) a los diferentes estados en que se dividió el parasitismo del *Telenomus alsophilae* sobre huevos de *Oxydia trychiata*. Análisis hecho a los datos transformados para normalizarlos ($\text{Sen}^{-1} \sqrt{n/100}$).

Estados	P a r á m e t r o s		
	Intercepción (a)	Coefficiente de regresión (b)	Coefficiente de correlación (r)
Huevos parásito no desarrollado	2.012	0.670**	0.985**
Huevos parásito no emergido	26.748	-0.180**	-0.950**
Huevos parásito emergido	72.069	-0.546**	-0.982**
Total huevos parasitados	88.235	-0.674**	-0.985**

** Significancia estadística al 0.01 de probabilidad.

disminuyó el porcentaje de emergencia de adultos. A los 15 días fue de 74.51% y descendió hasta 16.48% al cabo de los 100 días (Tabla 2). El coeficiente de correlación fue negativo y altamente significativo ($r = -0.9816$)** (Tabla 3).

En cuanto a los parásitos que se desarrollaron, pero que no emergieron de los huevos de *O. trychiata*, el análisis de regresión mostró un coeficiente de correlación negativo y altamente significativo ($r = -0.950$)** (Tabla 3), ya

que, a medida que aumentan los días de congelamiento, disminuye el número de parásitos que logran desarrollarse hasta el estado de pupa.

Respecto a los huevos que fueron atacados por *T. alsophilae* en que el parasitoide sólo se desarrolló hasta el estado de larva, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos (Tabla 2). El coeficiente de correlación fue positivo ($r = 0.985$)** (Tabla 3), lo cual demuestra el deterioro de los huevos para

el desarrollo del parasitoide a través del tiempo de congelación. El porcentaje de parásitos que no llegó al estado de pupa varió desde 8.15% para el tratamiento de 15 días de congelamiento hasta 79.78% a los 100 días.

La relación de sexos de parasitoides emergidos (Tabla 2) se obtuvo agrupando todos los individuos emergidos, sin tener en cuenta aquellas unidades experimentales en que no hubo emergencia del *T. alsophilae*. En la Tabla 1, la relación de sexos se calculó prome-

diando las repeticiones de cada tratamiento. Esta información tuvo una gran variación, debido a que en algunas unidades experimentales no hubo emergencia de adultos y, por este motivo, la discusión se basó en los datos de la Tabla 2. Igual tratamiento se dio a los datos de los parásitos no emergidos, ya que hubo posturas en donde *T. alsophilae* no se desarrolló hasta pupa.

En la relación de sexos de *T. alsophilae* emergidos no se encontraron diferencias significativas y, en todos los tratamientos (Tabla 2), la relación de sexos favoreció a las hembras, pues ésta varió desde 0.662 a los 15 días hasta 0.933 a los 100 días. Esto tiene su explicación en que, naturalmente, los himenópteros poseen una proporción sexual superior para hembras. En la relación de sexos de los especímenes que llegaron a pupa, que fue menor, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y varió de 0.500 para los 80 días hasta 0.706 a los 100 días (Tabla 2).

6.2. Congelamiento de Huevos de *O. trychiata* Parasitados y Almacenados en Bolsas Plásticas.

De un total de 5289 huevos de *O. trychiata* parasitados y con distintas edades de desarrollo del *T. alsophilae* que se sometieron a congelamiento (-6.76°C) durante 15 días, ninguno reasumió su desarrollo al retornarlos al ambiente. Lo mismo sucedió para los huevos en que los parasitoides estaban próximos a emerger (23 días de edad) que permanecieron 15 días (N= 240), 30 días (N= 164) y 45 días (N= 214).

Lo anterior demuestra que las diversas edades de desarrollo ensayadas de *T. alsophilae* no soportan este congelamiento, lo cual, posiblemente, se debe al rompimiento de las membranas celulares por efecto de la congelación del agua contenida intra y extracelularmente en los tejidos de los insectos, o sea, una consecuencia del deterioro de algunos organelos de su células.

Es posible que haciendo uso de otras temperaturas bajo cero y de sustancias crioprotectoras, como el glicerol, se

logre preservar vivos los estados inmaduros de *T. alsophilae* durante el congelamiento a través del tiempo.

6.3. Enfriamiento de Huevos de *O. trychiata* Parasitados.

En las posturas parasitadas por *T. alsophilae* que se almacenaron en desecador en una nevera a 4.15°C, durante 15, 30 y 45 días y que tenían 23 días de desarrollo del parasitoide sólo emergieron adultos las correspondientes al tratamiento de 15 días y en éste (N = 203) resultaron, únicamente, 52 machos (25.62%). En los tratamientos de 30 días (N= 263) y 45 días (N= 345) no se presentó ninguna emergencia de parasitoides. Al realizar las disecciones de huevos en todos estos tratamientos, se encontró que tanto hembras como machos, habían quedado sin emerger. Por lo tanto, se puede deducir que las hembras pueden ser más susceptibles al enfriamiento 4.15°C que los machos, ya que ninguna emergió en el tratamiento de 15 días y que, además, existe una proporción de machos que soporta mejor este enfriamiento.

Posiblemente, otras edades de desarrollo del parasitoide soporten mejor y por más tiempo el enfriamiento a 4°C, sin que lo afecte tan letalmente, lo mismo que a otros parásitos de huevos. Elevando un poco más la temperatura de almacenamiento de huevos parasitados, se podrían lograr mejores resultados en la conservación y emergencia de parásitos de huevos, ya que las fluctuaciones térmicas en los alrededores de 4°C pueden ser letales para muchos organismos poikilotérmicos, como los insectos, por lesionar sus células u organelos, si no están protegidos y/o almacenados correctamente.

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios anteriores permiten concluir que:

Los huevos recién depositados de *O. trychiata* se pueden almacenar bajo condiciones de congelamiento, ya que el embrión del huevo se muere y, por consiguiente, no emergen larvas, lo cual facilita su movilización hacia lugares en cuarentena. El *T. alsophilae* es capaz de parasitar estos huevos,

aunque su eficiencia disminuye a medida que se incrementa el tiempo de congelamiento del huésped.

El almacenamiento de huevos en bolsas plásticas al vacío es más eficiente y económico que en frascos herméticos, por lo cual se recomienda utilizarlo en la práctica.

El almacenamiento de huevos parasitados bajo condiciones de enfriamiento (4.15°C) y congelamiento (-6.76°C) no es recomendable, debido a que casi la totalidad de los estados inmaduros del parasitoide mueren durante el proceso.

Es posible que, con éste u otro huésped y/o parasitoide de huevos, se logre mejor preservación, a igual o distinta temperatura y forma de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los Drs. Carlos Díaz, Alfredo Saldarriaga y Francisco Posada, por las críticas y correcciones hechas al manuscrito. Al Sr. Gabriel Franco por la ayuda en la recolección de datos y a la Srta. Amantina Osorio por la labor de mecanografía.

7. LITERATURA CITADA

- ANDREWARTHA, H.G.; L.C. BIRCH. 1974. The distribution and abundance of animals. The University of Chicago Press, London, 782 p.
- BUSTILLO, A.E.; A.T. DROOZ. 1979. Método para la cría masiva del parásito de huevos *Telenomus alsophilae*. Seminario plagas forestales. Medellín, Septiembre 6-7, 1979, 149 p.
- , 1978. Control biológico del gusano medidor gigante del ciprés. Plegable de divulgación No. 127. ICA, Regional 4.
- , 1977. Cooperative establishment of a Virginia (USA) strain of *Telenomus alsophilae* on *Oxydia trychiata* in Colombia. J. Econ. Entomol. 70(6): 767-770.
- DROOZ, A.T. 1981. Subfreezing eggs of *Lambdina pellucidaria* (Lepidoptera: Geometridae) alters status as factitious host for *Ooencyrtus ennemophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae). Can. Entomol. 113:775-776.

- ; R.W. BARHAM. 1985. *Ooencyrtus ennemophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae) development in chilled vs. unchilled unfertilized eggs of *Eutrapela clemataria* (Lepidoptera: Geometridae). USDA. Forest Service. Res. Note SE-334, 2 p.
- ; A.E. BUSTILLO; G.F. FEDDE; V.H. FEDDE. 1977. North American egg parasite successfully controls a different host genus in South America. Science 197 (July): 390-391.
- ; H.T. SCHREUDER. 1972. Elm spanworm: models of eclosion as related to temperature and relative humidity in the laboratory. Environ. Entomol. 1(5): 582-588.
- ; J.D. SOLOMON. 1984. Temporal cold storage of eggs of the poplar tent maker, *Clostera inclusa* prior to use in rearing the egg parasite, *Ooencyrtus ennemophagus*. USDA Forest Service. Res. Note S0-304, 2 p.
- ; J.D. SOLOMON. 1980. Rearing the egg parasite *Ooencyrtus ennemophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae) on eggs of *Clostera inclusa* (Lepidoptera: Notodontidae) kept below freezing. Can. Entomol. 112:739-740.
- ; M.L. WEEMS. 1982. Cooling eggs of *Eutrapela clemataria* (Lepidoptera: Geometridae) to -10°C forestalls decline in parasite production with *Ooencyrtus ennemophagus* (Hymenoptera: Encyrtidae). Can. Entomol. 114: 1195-1196.
- EGWUATU, R.I.; T.A. TAYLOR. 1977. Development of *Gryon gnidus* (Hymenoptera: Scelionidae) in eggs of *Acanthomia tomentosicollis* (Hemiptera: Coreidae) killed either by gamma irradiation or by freezing. Bull. Entomol. Res. 67: 31-33.
- FEDDE, G.F. 1977. A laboratory study of egg parasitization capabilities of *Telenomus alsephilae*. Environ. Entomol. 6(6): 773-776.
- ; C.L. MORRIS; A.T. DROOZ. 1973. Delayed parasitism of fall cankerworm eggs in Virginia. Environ. Entomol. 6(6):1123-1125.
- FURNISS, R.L.; V.M. CAROLIN. 1977. Western forest insects. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Misc. Publ. No. 1339, 654 p.
- GENDUSCO, P. 1978. Cryopreservation of eggs of Heteroptera in liquid nitrogen for rearing of oophagous parasitoids. ATTI XI Italian Natn. Congr. Ent. 365-370 p.
- GENNADIEV, V.G.; E.D. KHLISTOVSKY. 1980. Long-Term cold storage of host eggs for reproduction of egg parasites of pest insects. Zhur. Obschei Biol. 41: 314-319.
- HERRERA, J.M. 1959. Nuevo equipo y técnica para la crianza masiva de avispas del género *Trichogramma*. Rev. Peruana de Entomol. Agric. 2(1): 30-35.
- MASNER, L. 1976. Revisionary notes and keys to world genera of Scelionidae (Hymenoptera—Proctotrupoidea). Mem. Entomol. Soc. Canada No. 97. 87 p.
- MEJIA, G.A.; R. VELEZ. 1983a. Parasitismo y cría masiva de *Gryon spp.* (Hymenoptera: Scelionidae) en huevos de *Leptoglossus sp.* (Hemiptera: Coreidae). Resúmenes X Congreso Socolen, Bogotá, p. 34.
- ; R. VELEZ. 1983b. Parasitismo y cría masiva de *Gryon spp.* (Hymenoptera: Scelionidae) en huevos de *Leptoglossus sp.* (Hemiptera: Coreidae). Seminario en biblioteca Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 66 p.
- RUIZ, D.L.; J.E. GARCIA. 1977. Niveles de parasitismo en posturas de *Diatraea saccharalis* por *Trichogramma spp.* en el cultivo de la caña de azúcar y su relación con algunos factores climáticos. Rev. Col. Entomol. 3(3-4): 71-78.
- SALDARRIAGA, A.; A.E. BUSTILLO. 1975. Del *Trichogramma* se sabe que... y otras observaciones sobre su parasitismo en huevos de *Oxydia sp.* cerca *trychiata* (Guenée) (Lepidoptera: Geometridae). Rev. Col. Entomol. 1(2-3): 39-54.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1972. The principles of insect physiology. Chapman and Hall Ltd., London. 7th edition. 827p.
- YERGAN, K.V. 1980. Effects of temperature on developmental rate of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 83(3): 339-342.