

## DETERMINISMO ENDOCRINO DE LA DIAPAUSA PUPAL EN *GRAELLSIA ISABELAE* (GRAELLS) (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE). EFECTO DE LA 20-HIDROXIECDISONA

F. YLLA<sup>1</sup> y X. BELLÉS<sup>2</sup>

### RESUMEN

El presente trabajo describe la capacidad de la 20-hidroxicdisona para provocar la muda imaginal en crisálidas en diapausa de *Graellsia isabelae*. La dosis de 5 y 2,5 µg/g de 20-hidroxicdisona indujeron la muda imaginal en todas las crisálidas. Sin embargo, mientras que casi todas las crisálidas tratadas con 2,5 µg/g dieron adultos morfológicamente normales, aquellas que recibieron 5 µg/g dieron adultos que mostraban anomalías en la morfología del abdomen y en el desarrollo y coloración de las alas. Los resultados sugieren que, al igual que sucede con otros lepidópteros, la diapausa pupal en *G. isabelae* viene determinada por bajos niveles circulantes de ecdisteroides y que la dosis de 2,5 µg/g de 20-hidroxicdisona es la más eficiente al provocar la muda imaginal en el 100% de los casos sin inducir malformaciones morfológicas en los adultos resultantes.

### INTRODUCCION

*Graellsia isabelae* es una especie univoltina que, al igual que muchas de las especies que habitan las zonas templadas, presenta una diapausa otoño-invernal obligada. Concretamente, la fase que experimenta la diapausa es la de crisálida, lo cual asegura su supervivencia durante la estación invernal, al poder soportar temperaturas puntuales de entre -10 y -12° C. Además, ello garantiza la sincronía de las emergencias de los adultos al llegar a la primavera siguiente.

Aparte de la información aportada por MASO e YLLA (1988), pocos son los datos que se conocen sobre la diapausa de *G. isabelae*, aunque uno de nosotros (JY) está preparando la publicación de diferentes observaciones al respecto, incluyendo datos sobre la terminación de la diapausa en condi-

ciones naturales, la capacidad de resistencia al frío de las crisálidas en diapausa, el punto de sobreenfriamiento de las mismas y la interrupción de la diapausa en el laboratorio.

Por lo que se refiere al determinismo endocrino de la diapausa de las crisálidas en lepidópteros, los datos obtenidos sobre diversas especies (véase DENLINGER, 1985) indican que la administración de 20-hidroxicdisona (una de las hormonas de muda de los insectos, véase BELLÉS, 1988) a estas crisálidas provoca la muda imaginal. Ello sugiere que la diapausa viene determinada por niveles bajos de esta hormona, lo cual ha sido efectivamente comprobado en varias especies en las que se han medido dichos niveles (véase DENLINGER, 1985).

En el presente trabajo hemos estudiado esta cuestión en la especie *G. isabelae*, comprobando que la administración de 20-hidroxicdisona a crisálidas en diapausa provoca la muda imaginal. Ello sugiere que, al igual que en otros lepidópteros, la diapausa pupal de *G. isabelae* viene determinada por una depresión de los niveles circulantes de dicha hormona.

<sup>1</sup> Urbanització Serrabonica. 08519 Gurb, Osona (Barcelona).

<sup>2</sup> Unidad de Fisiología de Insectos. Departamento de Agrobiología (CID, CSIC). Jordi Girona, 18. 08034 Barcelona.

## MATERIAL Y METODOS

### Cría del insecto

Las crisálidas utilizadas procedían de una colonia de larvas criada en cautividad a partir de puestas de hembras cautivas apareadas con machos silvestres. Tanto la cría de larvas como el apareamiento se llevó a cabo en jaulas situadas en un hábitat natural de la especie, un bosque de *Pinus sylvestris* de Gurb de la Plana, municipio de la comarca de Osona (Cataluña), situado a 650 m de altitud (UTM DG34). Las larvas se alimentaron exclusivamente sobre *Pinus sylvestris* y durante todo el período de cría estuvieron sometidas a las condiciones ambientales propias de los meses de junio y julio del hábitat mencionado.

Para la cría se asumieron numerosas sugerencias aportadas por diversos autores (BALCELLS y DICENTA, 1963; TEMPLADO y ALVAREZ, 1975; DUMON, 1986; SANETRA y PEUKER, 1991), siendo particularmente útiles en este sentido las observaciones de MONTOYA y HERNÁNDEZ (1974).

### Administración de la 20-hidroxicdisona

Se utilizaron 60 crisálidas que habían sido mantenidas en condiciones naturales desde finales de agosto de 1990, cuando crisalidaron, hasta diciembre del mismo año, en que se les administró 20-hidroxicdisona. Con estas 60 crisálidas se establecieron los cinco grupos experimentales descritos en la Tabla I. Con la 20-hidroxicdisona (Fig. 1) sintética (Sigma) se prepararon tres disoluciones (5 µg/µl, 2,5 µg/µl y 1 µg/µl) en líquido de Ringer con 5% de metanol y 0,002% de estreptomina.

Para obtener la dosis deseada en cada caso (5 µg/g, 2,5 µg/g y 1 µg/g) se inyectaron 1 µl/g de la solución correspondiente, pesando previamente la crisálida. El peso de las crisálidas utilizadas (machos:  $2,02 \pm 0,35$  g,  $n=22$ ; hembras:  $2,52 \pm 0,56$  g,  $n=38$ ) se hallaba dentro de los márgenes normales de la especie.

La administración de la 20-hidroxicdisona se llevó a cabo por inyección con una jeringa de Hamilton de 5 µl. La inyección se hacía entre el cuarto y el quinto segmento abdominal, en la zona ventrolateral. Previamente se inmovilizaba la crisálida manteniéndola unos diez minutos sobre hielo. El líquido de Ringer usado en las disoluciones se había esterilizado en autoclave, la aguja de la jeringa se flameaba entre dos inyecciones y la superficie de la cutícula donde se había de practicar la inyección se limpiaba previamente con una solución de hipoclorito sódico al 0,3%.

### Desarrollo de experimento y cuantificación de los resultados

Las crisálidas inyectadas eran incubadas a 25° C, 60-70% de humedad relativa y bajo un fotoperíodo de dieciséis horas de fotofase y ocho horas de escotofase. El período de incubación se fijó en ochenta y siete días, pasados los cuales las crisálidas que no habían mudado se transferían de nuevo a las condiciones naturales. Durante este período de ochenta y siete días se iban anotando los días de emergencia de adultos en los diferentes grupos experimentales y se observaba en cada caso la aparición de eventuales anomalías morfológicas.

TABLA I

GRUPOS EXPERIMENTALES PARA LOS ENSAYOS DE INTERRUPCION DE LA DIAPAUSA DE *G. ISABELAE* CON 20-HIDROXIECDISONA

Grupo	Crisálidas	Dosis
A .....	5 ♂♂, 7 ♀♀	5 µg/g
B .....	4 ♂♂, 8 ♀♀	2,5 µg/g
C .....	4 ♂♂, 8 ♀♀	1 µg/g
D .....	4 ♂♂, 8 ♀♀	0 (controles) <sup>1</sup>
E .....	5 ♂♂, 7 ♀♀	0 (testigos) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Crisálidas que recibieron una inyección de 2 µl/g de líquido de Ringer con 5% de metanol y 0,002% de estreptomina.

<sup>2</sup> Crisálidas que no recibieron ninguna inyección, aunque fueron pesadas y sometidas a las mismas condiciones de incubación que los restantes grupos.

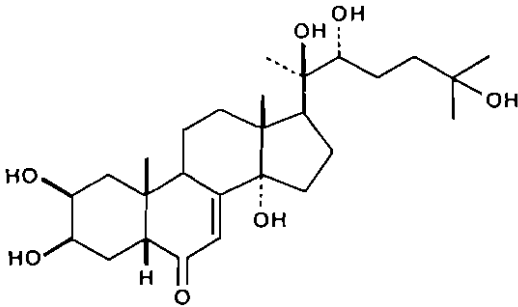


Fig. 1. Estructura de la 20-hidroxiciclidiona.

**RESULTADOS**

**Mortalidad**

Los tratamientos mencionados (Tabla I) no produjeron mortalidad alguna. Al finalizar el período de incubación, una parte de las crisálidas habían mudado a adulto (véase el siguiente apartado) y las crisálidas restantes tenían un aspecto normal y mostraban movilidad en el abdomen.

Sin embargo, conviene señalar que en experimentos previos en los que no se adicionó estreptomina al líquido de Ringer en que se disolvía la 20-hidroxiciclidiona, todas las crisálidas inyectadas murieron al cabo de unos seis días como consecuencia de una infección adquirida durante el tratamiento. Aunque la especie bacteriana que afecta más frecuentemente las crisálidas de los insectos en experimentos de este tipo es *Bacillus cereus* (BROWNING, 1981), en este caso el causante de la infección fue *Pseudomonas aeruginosa*. La realización de diversos antibiogramas con antibióticos diferentes nos llevó a usar la estreptomina a las dosis indicadas en las experiencias descritas aquí.

Conviene también mencionar que, transcurrido el período de incubación de ochenta y siete días, las crisálidas que no mudaron fueron devueltas a las condiciones naturales, y de éstas solamente emergieron dos adultos del grupo D, muriendo las restantes.

**Interrupción de la diapausa**

Los porcentajes de emergencias dentro del período de incubación se han representado en la Figura 2. Como puede observarse, las dosis de 5 y 2,5 µg/g de 20-hidroxiciclidiona (grupos A y B) fueron totalmente efectivas en este sentido. En cambio, de las 12 crisálidas tratadas con 1 µg/g

(grupo C) solamente dos mudaron a adulto y con un retraso considerable respecto a los dos grupos anteriores (véase el siguiente apartado). Por otro lado, una de las crisálidas del grupo D (controles) mudó a adulto, también con un considerable retraso respecto a los grupos A y B. En el grupo E (testigos) no se produjo ninguna muda.

**Dinámica de las emergencias**

La dosis de 20-hidroxiciclidiona, aparte de influir en el porcentaje de emergencias (Fig. 2), también influyó en la dinámica de las mismas (Fig. 3). En efecto, todas las crisálidas tratadas con 5 µg/g (grupo A) mudaron a adulto entre los días 11 y 13 tras el tratamiento, mientras que las inyectadas con 2,5 µg/g (grupo B) mudaron entre los días 12 y 15. Por otro lado, dentro de cada uno de estos grupos no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en cuanto a la dinámica de las emergencias (test *t*). En cambio, sí que se dieron diferencias significativas entre el grupo A y el B (considerando globalmente machos y hembras, test *t*, *p* < 0,0001). Por lo que se refiere al grupo C (tratamiento con 1 µg/g de 20-hidroxiciclidiona), las dos únicas crisálidas (dos machos de cuatro machos y ocho hembras) que mudaron a adulto lo hicieron los días 30 y 44. Es más dudoso atribuir estas emergencias a los efectos de la 20-hidroxiciclidiona puesto que un resultado similar se

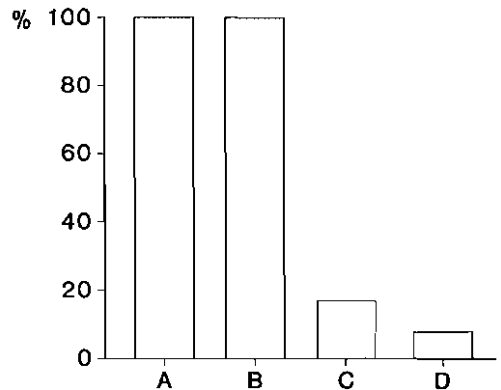


Fig. 2. Porcentaje de crisálidas de *Graellsia isabellae* que mudaron a adulto en los diferentes tratamientos con 20-hidroxiciclidiona. A: 5 µg. B: 2,5 µg/g. C: 1 µg/g. D: control (n = 12 en todos los casos).

observó en el grupo control D, en el que una crisálida macho (de cuatro machos y ocho hembras) mudó a adulto el día 35.

En la Figura 4 se ha representado el porcentaje acumulativo de mudas observadas en función del tiempo en los grupos A y B, para ilustrar más claramente la dinámica de las emergencias inducidas por la 20-hidroxicdisona.

#### Aparición de malformaciones morfológicas

Los 12 adultos emergidos de las crisálidas tratadas con 5  $\mu\text{g/g}$  de 20-hidroxicdisona (grupo A) presentaban, con mayor o menor intensidad, alguna de las anomalías siguientes (véase Lámina III):

— Coloración verde de las alas menos intensa, siendo más bien amarillada. Ocelos alares mal definidos, desdibujados, especialmente en los machos.

— Estiramiento alar anómalo, desde ligeramente deficiente, mostrando sólo los márgenes de las alas arrugados, hasta muy deficiente, con las alas prácticamente sin desplegar.

— Abdomen con deformaciones muy aparentes (gibas y depresiones), acompañadas de clapas de pubescencia.

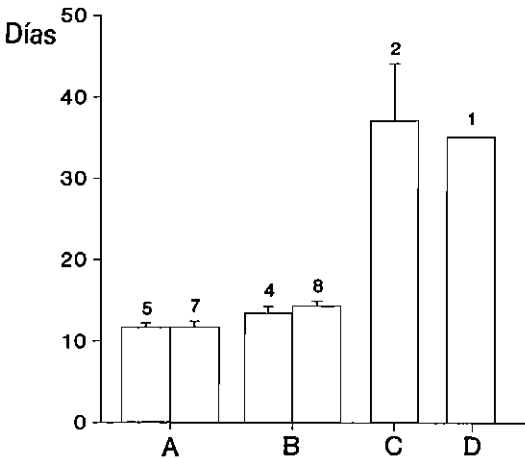


Fig. 3. Tiempo transcurrido (días) entre el tratamiento con 20-hidroxicdisona y la muda imaginal en las crisálidas de *Graellsia isabelae* (grupos experimentales como en la Figura 2). Los machos y las hembras se han diferenciado en columnas sombreadas y blancas, respectivamente. El segmento sobre cada columna representa la desviación típica y el número indica los ejemplares.

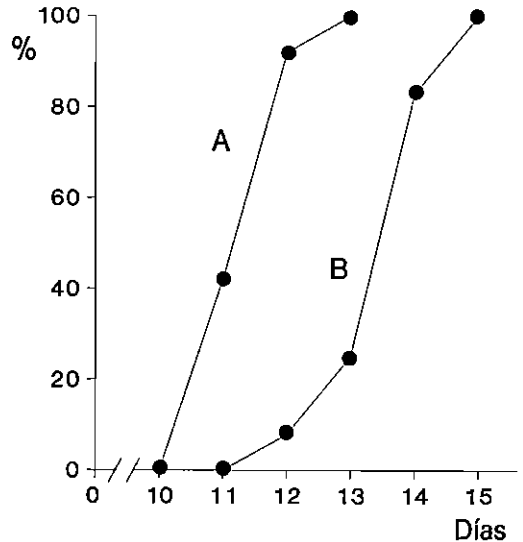


Fig. 4. Porcentaje acumulativo de las mudas observadas en función del tiempo (días) en las crisálidas de *Graellsia isabelae* tratadas con 5  $\mu\text{g/g}$  (A) y 2,5  $\mu\text{g/g}$  (B) de 20-hidroxicdisona ( $n = 12$  en ambos casos).

En cambio, en el grupo B, tratado con 2,5  $\mu\text{g/g}$  de 20-hidroxicdisona, solamente una de las hembras presentó las alas ligeramente mal desplegadas, mientras que los adultos restantes eran perfectamente normales.

#### DISCUSION

Los resultados obtenidos sugieren que, como en otras especies de lepidópteros (véase DENLINGER, 1985), la diapausa pupal en *G. isabelae* viene determinada por niveles bajos de ecdisteroides circulantes. De las dosis de 20-hidroxicdisona empleadas para provocar la interrupción de la diapausa, la de 2,5  $\mu\text{g/g}$  resultó ser la más apropiada, por cuanto indujo la muda imaginal en el 100% de los ejemplares en un tiempo razonable y casi sin provocar malformaciones en los mismos.

La inyección (tratados y controles) no provocó mortalidad. La única mortalidad observada se produjo tras retornar a las condiciones naturales las crisálidas que no mudaron durante el período de incubación. Sin embargo, dicha mortalidad no parece que deba atribuirse a los tratamientos, sino al efecto adverso de la temperatura de incubación relativamente elevada a que en plena diapausa fue-

ron sometidas estas crisálidas que no recibieron una dosis hormonal efectiva.

Por lo que se refiere a la interrupción de la diapausa, los resultados obtenidos sobre *G. isabelae* son comparables a los descritos para otros lepidópteros. Por ejemplo, WALDBAUER *et al.* (1978), trabajando con crisálidas del satúrnido *Hyalophora cecropia*, llegaron a unos resultados muy similares: una dosis de 2,5 µg/g de 20-hidroxiccdisona ejerció un notable efecto interruptor de la diapausa, mientras que 10 µg/g provocó la muerte de la mayoría de los ejemplares inyectados, afectados de graves malformaciones morfológicas. Siguiendo con los satúrnidos, WILLIAMS (1968) describió la interrupción de la diapausa de *Samia cynthia* después de una inyección de 2,5 µg/g de ecdisona o de 5 µg/g de 20-hidroxiccdisona. BODNARYK (1977), estudiando el noctúido *Mamestra configurata*, consiguió la interrupción de la diapausa administrando dosis comprendidas entre 0,3 y 4,9 µg/g de 20-hidroxiccdisona, según la edad de las crisálidas. Con crisálidas de ciento diez días, que es la edad que tenían las de *G. isabelae* usadas en nuestro estudio, fue necesario administrar unos 4 µg/g. BROWNING (1981), con el noctúido *Heliothis punctiger*, comprobó que las crisálidas interrumpían la diapausa al ser sometidas a una dosis de entre 0,1 y 1,5 µg de 20-hidroxiccdisona por crisálida. La cantidad a inyectar dependía, como en el caso anterior, de los días transcurridos desde la crisalidación. Para el esfingido *Manduca sexta*, la dosis efectiva de 20-hidroxiccdisona es, aproximadamente, 1,5 µg/g (BRADFIELD y DENLINGER, 1980).

La emergencia de un adulto en el grupo D (controles) cabe interpretarla como debida a las condiciones ambientales del período de incubación y quizá a algún efecto inespecífico de la inyección (como, por ejemplo, la inducción de cambios en la

presión hemolinfática), con lo que podría haberse provocado una cierta activación de la síntesis endógena de hormona de muda. La emergencia de dos ejemplares del grupo C (crisálidas tratadas con 1 µg/g de 20-hidroxiccdisona) creemos que debe interpretarse del mismo modo, dadas las similitudes en tiempo de emergencia desde la inyección con el ejemplar que acabamos de comentar. Así pues, la dosis de 1 µg/g estaría por debajo del umbral efectivo de la hormona cuando se administra de forma exógena.

Por lo que se refiere a las anomalías observadas en los ejemplares de *G. isabelae* tratados con 5 µg de 20-hidroxiccdisona (Lámina III), diversos autores (WILLIAMS, 1968; WALDBAUER *et al.*, 1978; DENLINGER, 1985) han observado que la administración de dosis altas de ecdisteroides en crisálidas de lepidópteros puede provocar la emergencia de adultos con malformaciones morfológicas diversas, desde anomalías en las escamas y en la coloración, hasta graves malformaciones morfológicas generalizadas. Dicha sintomatología ha sido calificada como hiperecdisonismo y al parecer viene determinada por niveles excesivos de ecdisteroides (WILLIAMS, 1968). Las características de los ejemplares malformados obtenidos en nuestras experiencias (véase Lámina III) corresponderían a casos de hiperecdisonismo leve. Sin embargo, algunas de las deformaciones abdominales acompañadas de falta de pubescencia recuerdan los efectos debidos a un exceso de hormona juvenil (véase COLL, 1988). La estrecha relación entre ambos sistemas hormonales, ecdisteroides y hormonas juveniles (véase BELLÉS, 1988) sugiere que la perturbación de uno de ellos afectará probablemente al otro. Así pues, parece razonable pensar que las malformaciones observadas serían más bien el resultado de un desequilibrio entre ambos sistemas hormonales.

## SUMMARY

The present paper describes the ability of 20-hydroxyecdysone to provoke the imaginal molt in diapausing pupae of *Graellsia isabelae*. Doses of 5 and 2.5 µg/g of 20-hydroxyecdysone induced the imaginal molt in all treated pupae. However, whereas almost all pupae treated with the dose of 2.5 µg/g gave morphologically normal adults, those which received 5 µg/g gave adults showing anomalies in abdomen morphology and wing development and coloration. The results suggest that, as in other lepidopterans, the pupal diapause in *G. isabelae* is determined by low circulating levels of ecdysteroids, and that the dose of 2.5 µg/g of 20-hydroxyecdysone is the most efficient as it provokes the imaginal molt in all cases and without inducing morphological abnormalities in the resulting adults.

## BIBLIOGRAFIA

- BALCELLS, E., y DICENTA, A., 1963: «Estudio biológico, morfológico y ecológico de *Graellsia isabelae* Graells y una nueva cita de *Ch. (Chrysotribax) rutilans* Dej. en el NE español». *Misc. Zool.*, 1 (5): 121-140.
- BELLÉS, X., 1988: «Las hormonas endocrinas de los insectos. Bases conceptuales para el diseño de insecticidas biorracionales». En: *Insecticidas biorracionales* (X. BELLÉS, ed.), pp. 15-67. Col. Nuevas Tendencias. CSIC, Madrid.
- BODNARYK, R. P., 1977: «Stages of diapause development in the pupa of *Mamestra configurata* based on  $\beta$ -ecdysone sensitivity index». *J. Insect Physiol.*, 23: 537-542.
- BRADFIELD, J. Y., y DENLINGER, D. L., 1980: «Diapause development in the Tobacco hornworm: A role for ecdysone or juvenile hormone?». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41: 101-107.
- BROWNING, T. O., 1981: «Ecdysteroids and diapause in pupae of *Heliothis punctiger*». *J. Insect Physiol.*, 27: 715-719.
- COLL, J., 1988: «Hormonas juveniles, juvenoides y juvenógenos». En: *Insecticidas biorracionales* (X. BELLÉS, ed.), pp. 87-112. Col. Nuevas Tendencias. CSIC, Madrid.
- DENLINGER, D. L., 1985: «Hormonal control of diapause». En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G. A. KERKUT y L. I. GILBERT, eds.), 8, pp. 353-412. Pergamon Press, Oxford.
- DUMON, D., 1976: «Élevage de *Graellsia isabeale*». *Alexandria*, 9: 205-207.
- MASO, A., e YLLA, J., 1989: «Consideraciones sobre la ecología, comportamiento, alimentación y biogeografía de *Graellsia isabeale* (Graells) (Lepidoptera: Saturniidae)». *Shilap*, 17 (65): 49-60.
- MONTOYA, R., y HERNÁNDEZ, R., 1974: «*Graellsia isabelae*». *Vida Silvestre*, 12: 207-221.
- SANETRA, M., y PEUKER, W., 1991: «Hinweise zur Zucht von *Graellsia isabelae* (Graells 1849) (Lepidoptera: Saturniidae)». *Nachr. entomol. Ver. Apollo, Frankfurt, N. F.*, 11 (4): 257-270.
- TEMPLADO, J., y ALVAREZ, J., 1975: «*Graellsia isabelae*, satúrnido endémico de España». *Bol. Serv. Plagas*, 1: 83-87.
- WALDBAUER, G. P.; STERNBURG, J. G., y WILSON, G. R., 1978: «The effect of injections of  $\beta$ -ecdysone on the bimodal emergence of *Hyalophora cecropia*». *J. Insect Physiol.*, 24: 623-628.
- WILLIAMS, C., 1968: «Ecdysone and ecdysone-analogues: their assay and action on diapausing pupae of the *Cynthia* silkworm». *Biol. Bull.*, 134: 344-355.