

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL



**“PATOGENICIDAD DE HONGOS NATIVOS EN EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (COLEOPTERA; SCARABAEIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”.**

RESPONSABLES:

BURGOS HUEZO, HUMBERTO EDGARDO  
MAZARIEGO HENRIQUEZ, GABRIELA GERALDINA  
SANCHEZ QUIÑONEZ, OSCAR WILFREDO

CIUDAD UNIVERSITARIA, 21 DE AGOSTO DE 2012.

**CONTRAPORTADA**

**CONTRAPORTADA**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS



**“PATOGENICIDAD DE HONGOS NATIVOS EN EL CONTROL DE GALLINA  
CIEGA (COLEOPTERA; SCARABAEIDAE) BAJO CONDICIONES DE  
LABORATORIO”.**

**POR:**

**BURGOS HUEZO, HUMBERTO EDGARDO  
MAZARIEGO HENRIQUEZ, GABRIELA GERALDINA  
SANCHEZ QUIÑONEZ, OSCAR WILFREDO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 21 DE AGOSTO DE 2012**

## RESUMEN

Debido a la importancia que el complejo "Gallina Ciega" (Coleóptera; Scarabaeidae) tiene para los productores agrícolas en El Salvador; se realizó, en el período de Junio de 2005 a Febrero de 2006 en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, la evaluación a nivel de laboratorio de la patogenicidad de 8 aislamientos fúngicos de los géneros *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces sp*, *Gliocladium sp*, Potrero 13 E.E.P Muestra "G" y Armando Arriaga sobre larvas de *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi*, recolectadas en sistemas agrícolas de maíz-maicillo situados en el departamento de Ahuachapán. Se realizaron dos pruebas bajo el diseño completamente al azar, utilizando para ello 126 y 36 larvas por ensayo. Los aislados fueron cultivados en dos medios comerciales: PDA (Papa Dextrosa Agar) suplementado con macerado de cutículas de larvas de Scarabaeidae, para la primera prueba y, ADS (Agar Dextrosa de Sabouraud), para la segunda. El inóculo utilizado para la preparación de suspensiones en cada una de las pruebas consistió en hongo de 25 y 42 días de edad. Con ellos se prepararon suspensiones de  $10^6$  y  $10^7$  conidias por mililitro, respectivamente para cada ensayo, las cuales fueron inoculadas por inmersión de las larvas en las mismas durante un minuto; con el objetivo de describir el comportamiento y sintomatología de la enfermedad y seleccionar aquellos aislamientos que causaran los mayores niveles de mortalidad en las larvas y que serían promisorios para evaluar en campo. En dichas pruebas pudo ser determinado que ninguno de los 8 aislamientos tuvo capacidad de producir patogenicidad, bajo las condiciones en que los mismos fueron evaluados sobre las especies de Scarabaeidae utilizadas, por factores tales como la especificidad en su rango de hospederos, estadio inadecuado de las larvas utilizadas y el uso de cultivos multiespóricos de los aislados. Esta situación plantea la necesidad de realizar pruebas sobre larvas jóvenes de Scarabaeidae obtenidas de una zona específica con aislados fúngicos monospóricos obtenidos de larvas enfermas de esa misma área geográfica, a través de su inoculación con suspensiones de mayores concentraciones a las utilizadas en la investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa Manejo Integrado de Plagas con Productores de América Central (PROMIPAC), por el apoyo económico brindado a la investigación, sin el cual no hubiera sido posible su realización y, en especial, al Ing. Douglas González, por su desinteresada colaboración a la misma.

A los asesores Ing. Leopoldo Serrano Cervantes y Blanca Daysi Ávila de Solano, por su incondicional colaboración en la realización de la investigación.

Al departamento de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) por permitirnos el acceso a sus instalaciones.

A los productores que permitieron las visitas a sus parcelas, Don Esteban Sandoval, José María Jacobo, Antonio González.

A todos los docentes y trabajadores de la Facultad de Ciencias Agronómicas que colaboraron en alguna forma en el desarrollo de la investigación.

## **DEDICATORIA**

A ESE SER SUPERIOR que me dio la capacidad para lograr esta meta.

A mis padres Jesús Edgardo Burgos y Zenayda Arely Huevo, quienes me han brindado su apoyo a lo largo de toda mi carrera y vida.

A mi hermano Jesús (Q.E.P.D.), por que lo prometido es deuda.

A mis otras dos familias por su ayuda en distintas etapas de mi vida.

A Marcela, quien ha sido mi apoyo a lo largo de los últimos años.

A todas aquellas personas que están y estuvieron a mi lado y que me han ayudado a ser lo que hoy soy.

Humberto Edgardo Burgos Huevo

## DEDICATORIA

A Dios todo poderoso, por su providencia que me acompañó durante toda mi carrera, por ser mi guía y aliento para alcanzar esta meta.

En especial a mi hermano Jesús Ernesto Mazariego, por su apoyo incondicional, por estar a mi lado cuando más lo necesite. ¡Sin él no la hubiera alcanzado!

A mis padres, Mercedes Henríquez y Jesús Mazariego, a quienes debo lo que ahora soy, por su apoyo y confianza.

A mi familia por creer en mí y apoyarme durante toda mi carrera.

A mis maestros y amigos que me enseñaron valores realmente valiosos que no se encuentran en los libros.

A mis amig@s que siempre han estado a mi lado ayudándome a alcanzar mis meta y a vencer mis dificultades.

Gabriela Geraldina Mazariego Henríquez.

## **DEDICATORIA**

A Dios todo poderoso, por haberme permitido alcanzar mis metas.

A mis padre, Guadalupe de Jesús Argueta y Ernesto Alejandro Argueta por su apoyo incondicional durante toda mi carrera y por la confianza que depositaron en mi que me anima a alcanzar mis metas.

Oscar Wilfredo Sánchez Quiñónez.

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN .....   | I   |
| AGRADECIMIENTOS .....                                       | II  |
| DEDICATORIA .....   | III |
| INDICE DE CUADROS .....                                     | XI  |
| INDICE DE FIGURAS .....                                     | XII |
| INDICE DE ANEXOS .....                                      | XIV |
| 1. INTRODUCCION .....                                       | 1   |
| 2. REVISION DE LITERATURA. ....                             | 3   |
| 2.1 LA GALLINA CIEGA “COLEOPTERA; SCARABAEIDAE” .....       | 3   |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica.....                         | 3   |
| 2.1.2 Características morfológicas.....                     | 3   |
| 2.1.3 Biología y ecología.....                              | 4   |
| 2.1.4. Distribución geográfica.....                         | 6   |
| 2.1.5. Cultivos afectados y daños. ....                     | 7   |
| 2.1.6 Géneros de importancia agroeconómica. ....            | 7   |
| 2.2 MANEJO DE LA PLAGA.....                                 | 8   |
| 2.2.1 Control químico.....                                  | 8   |
| 2.2.2 Control cultural.....                                 | 8   |
| 2.2.3 Control biológico a base de entomófagos.....          | 8   |
| 2.2.3.1 Uso de parasitoides. ....                           | 8   |
| 2.2.4 Control microbial. ....                               | 9   |
| 2.2.4.1. Definición. ....                                   | 9   |
| 2.2.4.2. Ventajas y desventajas del control microbial. .... | 9   |
| 2.2.5 Bacterias. ....                                       | 10  |
| 2.2.5.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                | 10  |
| 2.2.5.2. <i>Bacillus popilliae</i> . ....                   | 11  |
| 2.2.6 Rickettsias.....                                      | 11  |
| 2.2.7 Virus.....  | 11  |
| 2.2.8 Nemátodos.....  | 12  |
| 2.2.8.1 Importancia de la Familia Steinernematidae .....    | 13  |
| 2.2.8.2 Importancia de la Familia Heterorhabditidae.....    | 13  |
| 2.2.9 Hongos entomopatógenos. ....                          | 14  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.3 GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....</b>  | <b>14</b> |
| 2.3.1 Clasificación taxonómica.....  | 14        |
| 2.3.2. Características de la subdivisión Deuteromycotina.....                                      | 14        |
| 2.3.3 Características de los Hyphomycetes.....   | 15        |
| 2.3.4 Especificidad de los hongos entomopatógenos en su ataque. ....                               | 15        |
| 2.3.5 Etapas de desarrollo de la infección por hongos entomopatógenos.....                         | 16        |
| 2.3.5.1 Adhesión.....  | 16        |
| 2.3.5.2 Germinación.....   | 17        |
| 2.3.5.3 Penetración.....   | 18        |
| 2.3.5.4 Multiplicación del hongo en el hemocele.....   | 18        |
| 2.3.5.5 Producción de toxinas.....   | 19        |
| 2.3.5.6 Muerte del insecto.....  | 19        |
| 2.3.5.7 Colonización total.....  | 20        |
| 2.3.5.8 Emergencia del hongo hacia el exterior.....  | 20        |
| 2.3.5.9 Esporulación.....  | 20        |
| 2.3.5.10 Diseminación.....   | 21        |
| 2.3.6 Condiciones favorables para su desarrollo.....   | 21        |
| 2.3.6.1 Luz.....   | 22        |
| 2.3.6.2 Humedad relativa (HR).....   | 22        |
| 2.3.6.3 Temperatura.....   | 22        |
| <b>2.4 PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....</b>   | <b>23</b> |
| 2.4.1 Medios de cultivo utilizados en la producción masiva.....                                    | 23        |
| 2.4.1.1 Medios nutrientes comerciales y artificiales.....  | 23        |
| 2.4.1.2 Sustratos sólidos (Naturales).....   | 24        |
| <b>2.5 REACTIVACION DE LOS HONGOS.....</b>   | <b>24</b> |
| 2.5.1. Reactivación “In Vivo”.....   | 24        |
| 2.5.2 Uso de medio de cultivo con potencial inductor de virulencia:<br>Homogenizado de larvas..... | 25        |
| <b>2.6 ALGUNOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS ASOCIADOS AL CONTROL<br/>BIOLOGICO DE INSECTOS.....</b>      | <b>26</b> |
| 2.6.1. <i>Paecilomyces sp.</i> .....   | 26        |
| 2.6.2 <i>Beauveria sp.</i> .....   | 27        |
| 2.6.3 <i>Fusarium sp.</i> .....  | 29        |
| 2.6.4 <i>Metarhizium sp.</i> .....   | 30        |
| 2.6.5. <i>Aspergillus sp.</i> .....  | 32        |
| <b>2.7 CRITERIOS DE EVALUACION.....</b>  | <b>33</b> |
| 2.7.1 Porcentaje de mortalidad.....  | 33        |
| 2.7.2 Determinación de tiempo letal medio.....   | 33        |
| 2.7.3 Determinación de la capacidad de esporulación.....   | 33        |
| <b>3. MATERIALES Y METODOS.....</b>  | <b>34</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1. DURACION.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>34</b> |
| 3.2.1 Aislamientos de hongos entomopatógenos. ....   | 34        |
| 3.2.2 Larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).....  | 35        |
| <b>3.3 FASE PRE-EXPERIMENTAL. ....</b>   | <b>35</b> |
| 3.3.1. Fase de Campo.....  | 35        |
| 3.3.2. Monitoreo de larvas.....  | 38        |
| 3.3.3. Aislamiento de hongos de larvas enfermas. ....  | 38        |
| 3.3.4 Reconocimiento taxonómico de adultos.....  | 39        |
| 3.3.5 Percepción de la problemática por parte de los agricultores.....                                     | 40        |
| <b>3.4 FASE EXPERIMENTAL: PRIMERA PRUEBA DE PATOGENICIDAD. ....</b>  | <b>42</b> |
| 3.4.1 Fase de laboratorio. ....  | 42        |
| 3.4.1.1 Preparación de medios de cultivo. ....   | 42        |
| 3.4.1.2 Selección de aislamientos.....   | 43        |
| 3.4.1.3 Identificación de los aislamientos fúngicos utilizados en la primera prueba de patogenicidad. .... | 45        |
| 3.4.1.4 Purificación de los aislamientos de hongos. ....   | 46        |
| 3.4.2 Fase de campo. ....  | 46        |
| 3.4.3 Observación cuarentenaria de las larvas recolectadas.....  | 49        |
| 3.4.4 Reactivación de los aislamientos de hongos. ....   | 49        |
| 3.4.4.1. Reactivación “in vivo”.....   | 49        |
| 3.4.4.1.1. Reproducción masiva. ....   | 49        |
| 3.4.4.1.2. Preparación de suspensiones. ....   | 50        |
| 3.4.4.1.3. Recuento de conidias.....   | 51        |
| 3.4.4.1.4. Desinfección del sustrato. (Suelo).....   | 52        |
| 3.4.4.1.5. Inoculación de larvas.....  | 52        |
| 3.4.4.1.6. Monitoreo de respuesta a la inoculación. ....   | 55        |
| 3.4.4.2 Utilización de medio de cultivo suplementado con cutícula de insectos.....                         | 56        |
| 3.4.4.2.1. Preparación del medio de cultivo. ....  | 57        |
| 3.4.4.2.2. Reproducción masiva. ....   | 57        |
| 3.4.5 Fase de montaje del ensayo. ....   | 58        |
| 3.4.5.1 Desinfección del sustrato a utilizar. (suelo).....   | 58        |
| 3.4.5.2 Preparación de suspensiones.....   | 58        |
| 3.4.5.3 Recuento de conidias.....  | 59        |
| 3.4.5.4 Inoculación de larvas. ....  | 59        |
| 3.4.5.5 Monitoreo de respuesta a la inoculación.....   | 60        |
| 3.4.6 Identificación de las especies de larvas recolectadas. (Gallinas Ciegas).61                          |           |
| <b>3.5 FASE EXPERIMENTAL: SEGUNDA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....</b>   | <b>61</b> |
| 3.5.1 Fase de laboratorio. ....  | 61        |
| 3.5.1.1 Preparación del medio de cultivo. ....   | 61        |
| 3.5.1.2 Selección de aislamientos.....   | 62        |
| 3.5.1.3 Reproducción masiva de los hongos seleccionados.....   | 64        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.1.3.1 Crecimiento en medio de cultivo ADS.....  | 64        |
| 3.5.1.3.2 Crecimiento en sustrato sólido: arroz.....  | 65        |
| 3.5.1.3.3 Cosecha del producto fúngico.....   | 68        |
| 3.5.2 Fase de campo.....  | 68        |
| 3.5.3 Monitoreo de las larvas.....  | 70        |
| 3.5.5 Fase de montaje del ensayo.....   | 70        |
| 3.5.5.1. Desinfección del sustrato a utilizar.....  | 70        |
| 3.5.5.2 Preparación de suspensiones.....  | 70        |
| 3.5.5.3 Recuento de conidias.....   | 71        |
| 3.5.5.4 Inoculación de larvas.....  | 71        |
| 3.5.5.5 Monitoreo de respuesta a la inoculación.....  | 72        |
| <b>3.6. METODOLOGIA ESTADISTICA.....</b>  | <b>72</b> |
| 3.6.1. Factores en estudio.....   | 72        |
| 3.6.2. Descripción de tratamientos.....   | 72        |
| 3.6.3. Diseño y modelo estadístico.....   | 74        |
| 3.6.4 Distribución estadística.....   | 75        |
| 3.6.5 Hipótesis estadística.....  | 76        |
| 3.6.6. Variables evaluadas.....   | 77        |
| 3.6.6.1 Variables cuantitativas.....  | 77        |
| 3.6.6.2. Variables Cualitativas.....  | 77        |
| 3.6.7 Prueba estadística.....   | 78        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>4.1 FASE PREEXPORIMENTAL.....</b>  | <b>79</b> |
| 4.1.1 Fase de Campo.....  | 79        |
| 4.1.2 Monitoreo de larvas.....  | 80        |
| 4.1.3 Incidencia de micosis en el desarrollo de los insectos.....                                     | 81        |
| 4.1.4 Identificación de los adultos obtenidos.....  | 82        |
| 4.1.5 Aislamiento de hongos de larvas con signos.....   | 84        |
| <b>4.2 IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DE INSECTOS RECOLECTADAS EN EL MUNICIPIO DE AHUACHAPAN.....</b> | <b>85</b> |
| <b>4.3 REACTIVACION “IN VIVO” DE LOS AISLAMIENTOS FUNGICOS.....</b>                                   | <b>85</b> |
| <b>4.4 PRIMERA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>4.5 SEGUNDA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....</b>   | <b>89</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>92</b> |
| <b>6. RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>94</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>96</b> |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| <b>8. ANEXOS .....</b> | <b>104</b> |
|------------------------|------------|

## INDICE DE CUADROS

| <b>Cuadro</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 1. Composición cuali-cuantitativa de medio de Cultivo PDA (papa dextrosa agar).<br>.....                       | 43            |
| 2. Codificación de los aislamientos fúngicos usados en la primera prueba de patogenicidad. ....                | 44            |
| 3. Composición cuali-cuantitativa del medio de cultivo ADS (Agar dextrosa de Sabouraud).....                   | 62            |
| 4. Características de los aislamientos fúngicos seleccionados para la segunda prueba de patogenicidad. ....    | 63            |
| 5. Tratamientos utilizados en la primera prueba de patogenicidad. ....   | 73            |
| 6. Tratamientos utilizados en la segunda prueba de patogenicidad.....  | 74            |
| 7. Distribución estadística utilizada en las dos pruebas de patogenicidad realizadas en la investigación. .... | 76            |

## ANEXOS

|  |     |
|--|-----|
| 8. Utilización de la regla de Dyar para la uniformización del estadio de desarrollo de las larvas de las pruebas de patogenicidad..... | 112 |
| 9. Análisis de varianza realizado a los resultados obtenidos de la primera prueba de patogenicidad. ....                               | 113 |

## INDICE DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| 1. Larvas típicas de “Gallina Ciega” (Scarabaeidae).....  | 4      |
| 2. Ciclo biológico anual de “Gallina Ciega” ( <i>Phyllophaga sp.</i> ).....   | 5      |
| 3. Ciclo biológico bianual de “Gallina Ciega” ( <i>Phyllophaga sp.</i> ).....   | 6      |
| 4. Ciclo de la enfermedad fúngica.....  | 21     |
| 5. Esquema de conidióforos y conidias de <i>Paecilomyces sp</i> .....   | 26     |
| 6. Microfotografía de conidias y conidióforo de <i>P. fumosoroseus</i> . ....   | 27     |
| 7. Microfotografía de conidias de <i>Beauveria bassiana</i> . ....  | 28     |
| 8. Microfotografía de <i>Fusarium sp.</i> .....   | 30     |
| 9. Detalle de las estructuras de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....  | 31     |
| 10. Microfotografía de <i>Aspergillus sp.</i> .....   | 33     |
| 11. Parte de las larvas de Scarabaeidae recolectadas en la localidad de<br>Tonacatepeque (junio del 2005).....  | 36     |
| 12. Aislamiento individual de larvas en frascos de 3 onzas (junio 2005).....  | 37     |
| 13. Colocación de las larvas en hielera para su transporte (junio 2005) .....   | 37     |
| 14. Esquema mostrando la forma de preparación de las diluciones seriadas para la<br>obtención de los aislados de hongos .....   | 39     |
| 15. Entrevista al Señor Esteban Sandoval en que manifiesta la problemática de la<br>“Gallina Ciega” en su parcela. ....   | 41     |
| 16. Entrevista a Don José María Jacobo en que manifiesta la problemática de la<br>“Gallina Ciega” en su parcela.....  | 41     |
| 17. Entrevista a Don Antonio González en que manifiesta la problemática de<br>“Gallina Ciega” en su parcela.....  | 42     |
| 18. Parte de las herramientas y metodología usadas en la recolección de larvas de<br>Scarabaeidae en los cantones San Lázaro y El Tigre, Ahuachapán septiembre del<br>2005. ....      | 47     |
| 19. Daño de “gallina ciega” caracterizado por el ataque de franjas dispersas en<br>terreno cultivado con maíz-maicillo en el Cantón El Tigre, Ahuachapán septiembre<br>del 2005. .... | 48     |
| 20. Nivel de abundancia de larvas de Scarabaeidae alimentándose de las raíces<br>de planta joven de maíz en el cantón El Tigre, Ahuachapán septiembre del 2005.<br>.....              | 48     |
| 21. Metodología para la preparación de las suspensiones fúngicas .....  | 51     |
| 22. Esquema de la vista microscópica de la cámara de Neubauer y celda para<br>conteo de conidias. ....  | 52     |
| 23. Metodología para la inoculación de las larvas de Scarabaeidae.....  | 53     |
| 24. Frascos plásticos, tapados, utilizados para confinamiento de larvas de gallina<br>ciega inoculadas con los aislados fúngicos.....   | 54     |
| 25. Procedimiento de revisión habitual de las larvas de Scarabaeidae inoculadas.<br>.....   | 56     |
| 26. Suspensiones fúngicas obtenidas para la inoculación de las larvas. ....   | 59     |
| 27. Aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces sp.</i> .....   | 65     |
| 28. Metodología para la inoculación de los hongos entomopatógenos en sustrato<br>sólido (arroz). ....   | 67     |

|  |    |
|--|----|
| 29. Daño causado por larvas de Scarabaeidae en franjas en un cultivo de maicillo en el Cantón El Tigre, Ahuachapán Diciembre del 2005.....   | 68 |
| 30. Metodología utilizada para la recolección de larvas de Scarabaeidae en el período de época seca en el Cantón El Tigre, Ahuachapán Diciembre del 2005.                            | 69 |
| 31. Porcentaje total de larvas de Scarabaeidae recolectadas en la localidad de Tonacatepeque el 20 de junio de 2005, en un cultivo de maíz. ....                                     | 79 |
| 32. Mortalidad de larvas de Scarabaeidae por fecha de revisión y acumulada causada por hongos nativos en una parcela de maíz en la localidad de Tonacatepeque (Jun-Sep 2005).....    | 80 |
| 33. Incidencia de infección fúngica natural por estadio de desarrollo en insectos Scarabaeidae recolectados en la localidad de Tonacatepeque en un cultivo de maíz. (Jun 2005). .... | 81 |
| 34. Cantidad de insectos adultos obtenidos clasificados a nivel de género en la localidad de Tonacatepeque. (Jun-sep 2005). ....   | 82 |
| 35. Adultos obtenidos de la localidad de Tonacatepeque (Junio de 2005). ....   | 83 |
| 36. Resultados finales en la revisión del lote de larvas de scarabaeidae recolectadas en una parcela de maíz en la localidad de Tonacatepeque. (Jun-sep 2005) .....                  | 84 |
| 37. Porcentaje de larvas de Scarabaeidae muertas por cada tratamiento 21 DDI en la primera prueba de patogenicidad. ....   | 86 |
| 38. Porcentaje de mortalidad de larvas de Scarabaeidae por tratamiento después de 23 DDI en la primera prueba de patogenicidad. ....   | 87 |
| 39. Numero de larvas de Scarabaeidae muertas desde los 3 hasta los 23 DDI en la primera prueba de patogenicidad.....   | 88 |

## ANEXOS

|  |     |
|--|-----|
| A1. Mapa de ubicación de zonas de importancia: trabajo de campo y laboratorio. | 104 |
| <u>A</u> 7. Distribución de los tratamientos en el laboratorio. ....           | 111 |

## INDICE DE ANEXOS

| Anexo  | Página |
|--|--------|
| 1. Mapa de ubicación de zonas de importancia: trabajo de campo y laboratorio.  | 104    |
| 2. Formulario de registro de información asociada al material biológico. ....  | 105    |
| 3. Hoja de toma de datos de los tratamientos en estudio.....   | 107    |
| 4. Preparación de medio de cultivo PDA. ....   | 108    |
| 5. Preparación de la solución amortiguadora fosfato pH 7. ....   | 109    |
| 6. Preparación de medio de cultivo ADS. ....   | 110    |
| 7. Distribución de los tratamientos en el laboratorio.....   | 111    |
| 8. Utilización de la regla de Dyar para la uniformización del estadio de desarrollo de las larvas de las pruebas de patogenicidad..... | 112    |
| 9. Análisis de varianza realizado a los resultados obtenidos de la primera prueba de patogenicidad. ....                               | 113    |

## 1. INTRODUCCION

El complejo "Gallina Ciega" comprende una serie de géneros dentro de la familia Scarabaeidae del Orden Coleóptera, entre los cuales se pueden citar: *Anomala sp*, *Cyclocephala sp*, *Bothynus sp*, y *Phyllophaga sp*, que es el género mas representativo y conocido dentro del complejo mencionado. (Parada, 1999).

Esta plaga presenta un manejo difícil debido a la ocurrencia de diversos factores como son su carácter cosmopolita que incluye una diversidad de hospederos, diferentes ciclos de vida, amplia distribución en localidades con características agroclimáticas diferentes y hábitos edáficos poco estudiados. (Arguello et al, 1999)

Sus hábitos alimenticios incluyen una verdadera diversidad de hospederos que incluyen cultivos de importancia económica como granos básicos, frutales, ornamentales, viveros forestales y pastos, entre algunos dentro de una lista tan grande como diversa. (Coto, 2000).

Los daños asociados a la presencia de las larvas en los cultivos van desde la deficiencia de agua y nutrimentos, alta susceptibilidad al acame, bajo rendimiento y, en casos severos, pueden llegar hasta la muerte, dependiendo de la severidad del daño (Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS-DANIDA), 2004 a) y, se estima que, sólo en Latinoamérica, las perdidas en el cultivo del maíz ascienden a 135 millones de dólares.

En El Salvador, ésta es una de las plagas más problemáticas a las que se enfrentan los granos básicos, ya que, solamente en el cultivo de maíz puede causar pérdidas hasta del 50% de las plántulas y, además, su control implica elevados costos económicos y ambientales (Coto, 2000). Por esta razón, se ha hecho necesaria la investigación y adopción de nuevos métodos de control de plagas que sean amigables con el medio ambiente, reduzcan el uso de insecticidas sintéticos de uso tradicional en la agricultura y, por ende, disminuyan los costos económicos para su control (Parada, 1999); presentándose el control

microbiano de insectos plaga, en este momento, como una opción novedosa que actúa de forma específica sin ocasionar daños a enemigos naturales y humanos. (Cano et al 2004) b. Actualmente, se está impulsando el uso de hongos entomopatógenos, los cuales han sido ampliamente estudiados en diversas investigaciones desde que Agostino Bassi en 1834, demostró que el hongo *Beauveria bassiana* era el causante de enfermedad en el gusano de la seda. (Lecuona, 1996).

Es por ello que en esta investigación, llevada a cabo desde mediados de Junio de 2005 hasta finales de febrero de 2006, se realizó la evaluación de la patogenicidad de ocho aislamientos de hongos nativos de los géneros *Aspergillus sp*, dos aislamientos de *Fusarium sp*, *Gliocladium sp*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces sp* y otros aislamientos identificados como Potrero 13 E.E.P muestra "G" y Armando Arriaga (de los cuales no se tiene identificación), en condiciones in Vitro en las instalaciones del laboratorio del Departamento de Protección Vegetal (Lab. No. 3) de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador sobre larvas de Gallina Ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) pertenecientes a las especies *Phyllophaga elenans*, *P. obsoleta* y *P. menetriesi*, las que fueron recolectadas en dos localidades agrícolas del Municipio de Ahuachapán, con el objetivo de establecer la sintomatología de la enfermedad y el comportamiento de las larvas ante la infección fúngica y seleccionar aquellos aislamientos promisorios para llevar a cabo pruebas posteriores a nivel de campo en parcelas experimentales o de agricultores, basados en su capacidad patogénica sobre larvas de Scarabaeidae.

## 2. REVISION DE LITERATURA.

### 2.1 LA GALLINA CIEGA “COLEOPTERA; SCARABAEIDAE”.

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica de la Gallina Ciega es la siguiente:

- Reino: Animal.
- Clase: Insecta.
- Orden: Coleóptera.
- Familia: Scarabaeidae.

Dentro de ésta se halla el género *Phyllophaga sp*, considerado por la literatura como el más representativo del complejo “Gallina Ciega” (Parada, 1999). Este género es el de mayor importancia económica dentro de lo que ha sido denominado el “complejo Gallina Ciega”. (Argüello et al, 1999)

#### 2.1.2 Características morfológicas.

Por ser *Phyllophaga* el género de mayor importancia económica dentro de la familia Scarabaeidae, las siguientes consideraciones morfológicas son basadas en el mismo. En general, los adultos son escarabajos que varían desde tonalidades de pardo sin lustre, pardo rojizo hasta bicoloreados sin lustre, oscilando su tamaño entre 9 y 29 mm, de acuerdo a la especie de que se trate. (Trabanino, 1998)

Las larvas de tercer instar, que es el estadio más conocido dentro del ciclo biológico del insecto, son blancuzcas o cremosas de tipo escarabaeiforme (forma de “C” y gordas), carnosas y arrugadas, con la cabeza grande, hipognata y densamente esclerotizada de color café o rojiza, pueden alcanzar tamaños hasta de 5 cm., con patas bien desarrolladas y a menudo velludas. (Trabanino, 1998). Estas características se muestran en la figura 1.



Figura 1. Larvas típicas de “Gallina Ciega” (Scarabaeidae).

Tomado de: Laguna et al. 2004. Manejo Integrado de Plagas: Cultivo de la Chiltoma: Guía MIP.

### 2.1.3 Biología y ecología.

Los miembros de la familia Scarabaeidae por ser insectos holometábolos pasan por las siguientes etapas en su desarrollo: Huevo, larva, pupa y adulto.

La segunda etapa es la que recibe el nombre de “gallina ciega” y es la más dañina del insecto para cualquier cultivo, sobre todo el tercer instar en el que realmente se alimentan de tejidos vegetales vivos como los tubérculos (en el caso de la papa), raíces, plántulas y plantas jóvenes de los cultivos. (Aguilar et al, 2004).

Para hacerse de la idea del conocimiento que, de esta plaga se tiene en la región centroamericana, Ayala et al (1997), hace referencia a las diferentes denominaciones o nombres comunes que la misma recibe en los distintos países de dicha región y, a través de la cual, se demuestra su presencia en ellos:

- Guatemala: Ronrones de mayo.
- El Salvador: Chicotes o ronrones.
- Costa Rica: Abejones de mayo.
- Nicaragua: Ronrones y chorontocos.
- Panamá: Escarabajos y totorriones.
- Honduras: Ronrones y chorontocos.

Dentro de la familia Scarabaeidae del Orden Coleóptera, se halla una diferencia bastante clara en lo que a ciclo biológico se refiere, pues se ha establecido la existencia de especies de ciclo anual y bianual dentro de ella.

## Gallina ciega de ciclo anual.

Puesto que, el término gallina ciega engloba una diversidad de géneros y especies; las siguientes consideraciones son basadas en el género *Phyllophaga* sp, que es el género de mayor importancia agroeconómica reportado.

En general, los adultos emergen del suelo cuando inician las lluvias, se alimentan del follaje de arbustos, árboles y ciertas plantas anuales. Los adultos regresan al suelo durante el día, que es cuando las hembras ovipositan. Las larvas eclosionan de los huevos en un lapso de dos semanas y, los dos primeros instares se alimentan de materia orgánica y raíces tiernas por unas 4 a 6 semanas, mientras que el tercer instar dura cerca de 6 a 8 semanas, periodo en que ocasionan los mayores daños alimentándose de las raíces de las plantas. La prepupa forma una celda en el suelo a una profundidad de 6 a 20 cm. donde permanece hasta diciembre o enero. Los adultos que emergen en enero o febrero permanecen en su celda hasta que las lluvias de mayo o junio penetran en el suelo y deshacen la pelota de tierra que los envuelve. (Trabanino, 1998).Dicho ciclo se muestra en la figura 2.



Figura 2. Ciclo biológico anual de “Gallina Ciega” (*Phyllophaga* sp).

Tomado de: Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS – DANIDA). 2004b. Cultivando frijol con menos riesgo.

### **Gallina ciega de ciclo bianual.**

El ciclo inicial es similar pero, al terminar su segundo instar, la larva entra en una fase de latencia en una celda en el suelo, al iniciar las lluvias de nuevo, muda y en el tercer instar se alimenta de las raíces, entre mayo y septiembre. El período pupal termina en febrero o marzo. (Trabanino, 1998). Ver figura 3.



Figura 3. Ciclo biológico bianual de “Gallina Ciega” (*Phyllophaga sp.*).

Tomado de: Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS – DANIDA). 2004 b. Cultivando frijol con menos riesgo.

#### **2.1.4. Distribución geográfica.**

Los insectos de la familia Scarabaeidae tienen en realidad una distribución bastante cosmopolita a nivel americano pues, se los halla en localidades con características agroclimáticas diferentes y ambientes edáficos de lo más variados. (Argüello et al, 1997).

King (1984) citado por Orantes (1997), afirma que la distribución de especies del género *Phyllophaga sp* de importancia económica es un poco limitada, y parece estar relacionada a la cantidad y distribución de precipitación pluvial y elevación sobre el nivel del mar. Las especies que poseen un ciclo vital de un año aparecen principalmente en alturas entre moderadas y altas y en las zonas más húmedas, en particular en el sur (centroamericano), que tienen una corta estación seca de 2-3 meses, mientras que, las especies que tienen un ciclo vital de dos años tienden a estar confinadas en tierras más bajas, caracterizadas por temperaturas medias más elevadas y baja precipitación pluvial, con largas estaciones secas de 4-6 meses junto con la presencia de una corriente o un veranillo bien definido en el mes de agosto. Dicho autor menciona, además, que el género *Phyllophaga sp* se encuentra distribuido a lo largo y ancho de América Latina y el Caribe.

### **2.1.5. Cultivos afectados y daños.**

La “Gallina Ciega” tiene un amplio rango de hospederos, entre los que se cuenta: Maíz, sorgo, arroz de secano, papa, frijol, solanáceas, camote, diversas hortalizas, pastos, plantas silvestres y diversos cultivos perennes como café y frutales. (Trabanino, 1998).

En el caso de los adultos, el daño principal consiste en la defoliación a que someten las plantas, cuyas hojas presentan márgenes irregulares; este daño puede ser de importancia económica en los cultivos de jocote, cítricos jóvenes y plantas ornamentales. Por otro lado el daño causado por las larvas se considera de importancia más relevante en la mayoría de los cultivos, pues, en general, las plantas afectadas por ellas, no crecen bien, presentan síntomas de deficiencia de agua y nutrimentos, alta susceptibilidad al acame, de bajo rendimiento y pueden llegar hasta la muerte, dependiendo de la severidad del daño. (Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS-DANIDA), 2004a).

A continuación se describen los daños en algunos cultivos específicos de importancia económica:

En el caso de la papa, las larvas destruyen los tubérculos.

En el caso del maíz, así como para diversos granos básicos, incluido el frijol, en los primeros 30 días del cultivo, las plantas presentan una coloración amarilla, se marchitan en las horas más soleadas, dejan de crecer y mueren. El daño tiene la característica de manifestarse en forma de parche o manchas formadas por grupos de plantas débiles o muertas dentro del área sembrada. (Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS-DANIDA), 2004a).

### **2.1.6 Géneros de importancia agroeconómica.**

Dentro de la familia Scarabaeidae, se halla una diversidad de géneros y especies atacando cultivos de importancia alimenticia y económica, tales como *Anomala sp*, *Cyclocephala sp*, *Bothynus sp* y *Phyllophaga sp*; solamente dentro de este último, Bentley (2001). Se menciona que existen incluso 17 especies, entre las cuales, se reporta para la región centroamericana como asociadas a los cultivos las especies siguientes: *P. menetriesi*, *P. vicina*, *P. elenans*, *P. parvisetis*. (Coto, 2000)

Argüello et al (1999), menciona, sin embargo, que *Anomala sp* y *Cyclocephala sp* han sido catalogadas como plagas potencial y ocasional, respectivamente, en la República de Nicaragua.

## **2.2 MANEJO DE LA PLAGA.**

### **2.2.1 Control químico.**

En este control, Ayala et al (1997), menciona que los mejores resultados se han obtenido con los tratadores de semillas; los cuales se pueden aplicar de acuerdo a la densidad de la plaga, al momento de la siembra o en la preparación del suelo. Entre los insecticidas aplicados al suelo están terbufos (counter), phorate (thimet), y ethoprop (mocap). (CASSA, 2001)

### **2.2.2 Control cultural.**

En términos generales, la buena preparación del suelo elimina muchas larvas y huevos, mientras que expone a otras a la acción de los enemigos naturales (Coto, 2000) como las gallinas, los pájaros y otros animales, y algunas otras mueren por deshidratación. De igual manera, se podrá recolectar y destruir manualmente los adultos que salen del suelo, para bajar las poblaciones de gallina ciega en el campo. Una medida cultural utilizada para atrapar insectos adultos consiste en la utilización de trampas de luz para atraerlos, para ser posteriormente destruidos. (Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS-DANIDA), 2004 a).

### **2.2.3 Control biológico a base de entomófagos.**

El control biológico, es el uso de organismos vivos, tales como parasitoides, depredadores y microbios para el control de plagas y, tales organismos usados son llamados enemigos naturales. (Archer et al, 2001)

#### **2.2.3.1 Uso de parasitoides.**

El parasitoide es un insecto parásito que, en su estado inmaduro, se alimenta y desarrolla dentro o sobre el cuerpo de un solo insecto hospedante al cual mata lentamente o bien se desarrolla dentro de los huevecillos de éste. Por lo general,

son más pequeños que el hospedante. El estado adulto vive libre, no siendo parasitoide. Su hospedante pertenece a la misma clase taxonómica o una clase estrechamente relacionada. La mayoría de los parasitoides (85%) son del orden Hymenóptera y unos pocos (15%) son del orden Díptera. (Cano et al, 2004) b.

En el caso específico de los parásitos Himenópteros la familia más sobresaliente son Tiphidae y Scoliidae (*Capsomeris dorsata* y *Tiphia sp*), y algunos de el orden Díptera tales como Asilidae, Tachinidae, los cuales se hallan atacando larvas de Scarabaeidae (Trabanino, 1998), mientras que los dípteros, Asilidae y Bombylidae atacan las pupas y los adultos son parasitados por Tachinidae y Pyrgotidae. (Coto, 2000).

#### **2.2.4 Control microbial.**

De acuerdo con Echevoyén et al (2004), el tema puede resumirse así:

##### **2.2.4.1. Definición.**

El control microbial puede definirse como la utilización de microorganismos patógenos, para el manejo de poblaciones de organismos plaga: insectos, fitopatógenos y malezas, por lo que debe ser considerado como una subdivisión del control biológico como tal.

##### **2.2.4.2. Ventajas y desventajas del control microbial.**

Algunos de los puntos a favor y en contra del control microbial, se presentan a continuación:

##### **Ventajas**

1. Especificidad
2. Ambientalmente seguro
3. Alta virulencia contra la especie a controlar
4. Compatible con otros tipos de control (químico, biológico, cultural)
5. Disponibilidad de fuentes naturales.

##### **Desventajas**

1. Especificidad excesiva (no útil contra diversas plagas relacionadas)
2. Relativamente de alto costo
3. Problemas técnicos y logísticos en la producción y aplicación.
4. Susceptibilidad a factores medioambientales.

## **2.2.5 Bacterias.**

De acuerdo a Cano et al (2004) a, el tema puede resumirse así:

Las bacterias entomopatógenas son organismos unicelulares que miden entre menos de un micrómetro a varios micrómetros y carecen de núcleo definido. Se reproducen por fisión binaria o por reproducción sexual. Las bacterias pueden causar infecciones leves en los insectos o encontrarse presentes en sus cadáveres pero, solo en algunos casos es la causa primaria de mortalidad. Se clasifican en dos categorías: Las bacterias esporulantes por su capacidad de formar esporas poseen una alta persistencia en el ambiente, son altamente virulentas y tienen una gran capacidad invasiva y de producción de toxinas e incluyen todas aquellas que actúan como patógenos obligados y facultativos.

Todas ellas pertenecen a la familia Bacillaceae. En este grupo, se encuentran los Bacillus como *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis*. Por otro lado, las bacterias no esporulantes generalmente son comunes en el tracto digestivo de los insectos pero, raramente tienen capacidad invasiva intrínseca. A este grupo, pertenecen las bacterias de la familia Pseudomonadaceae como *Pseudomonas sp*, la familia Streptococcaceae y la Enterobacteriaceae, la cual esta representada por el género *Serratia sp*.

A continuación se presenta una breve referencia a dos de las bacterias que han tenido mayor uso dentro del control biológico de insectos:

### **2.2.5.1. *Bacillus thuringiensis*.**

Ha sido producido como un bioplaguicida desde inicios de 1950. Este ocupa, aproximadamente el 90% del mercado de los bioplaguicidas, produciéndose anualmente cerca de 13,000 toneladas del mismo. (Cano et al, 2004) b. Sin embargo, el descubrimiento de cepas activas sobre larvas de scarabeidos ha sido bastante reciente, esperando que pronto se puedan hallar formulaciones para estas plagas. (Hidalgo, 2001).

Básicamente, su acción está basada en la producción de tres exotoxinas, la beta, alfa y la gama y otra endotoxina, denominada delta endotoxina, la cual es producida a partir de las protoxinas resultantes de la degradación del cristal

proteico por enzimas proteolíticas en el intestino del insecto, que ha demostrado ser agente principal del efecto insecticida.

(Cano et al, 2004) b.

#### **2.2.5.2. *Bacillus popilliae*.**

De esta especie se ha establecido su condición de parásito obligado. Esta bacteria tiene la capacidad de formar esporas muy resistentes a las condiciones adversas del medio, como la desecación y la radiación, lo que le confiere una ventaja para establecerse en control biológico. (Cano et al, 2004b; Hidalgo, 2001).

Es causante de la “enfermedad lechosa” de los escarabajos, ocurriendo solamente en Scarabaeidae. Ha sido relacionada con 29 especies de Scarabeidos, sobre todo en Melolonthinae y Rutelinae.

Las larvas se infectan al ingerir alimentos contaminados con esporas de la bacteria, las que al entrar al tracto digestivo del animal germinan e infectan, ocurriendo la muerte al cabo de poco más de un mes post-infección.

#### **2.2.6 Rickettsias.**

De este grupo de patógenos se ha encontrado la especie *Rickettsiella popilliae*, causando enfermedades letales en varias especies de Scarabeidos. La infección se da por vía ingestión y la muerte, se puede alcanzar hasta 6 meses después de la misma.

Su producción potencial como patógeno se ve limitada por su necesidad de crecimiento en células vivas y por ser patógenos potenciales para vertebrados. (Hidalgo, 2001)

#### **2.2.7 Virus.**

Los virus entomopatógenos son considerados entidades infecciosas cuyo genoma está constituido por ácido nucleico, ya sea ADN o ARN. Son patógenos obligados ya que necesitan de un organismo vivo, el hospedante, para poder multiplicarse y diseminarse en el agroecosistema. (Cano et al, 2004 b).

Aquellos virus con potencialidad patógena en insectos, se hallan clasificados dentro de dos grandes grupos:

- a) Los que presentan un cuerpo de inclusión de naturaleza proteica, visibles al microscopio óptico. Entre ellos podemos mencionar los baculovirus (el virus de poliedrosis nuclear VPN, y el virus de granulosis VG, los virus de poliedrosis citoplasmática VPC y los Entomopoxvirus).
- b) Los que no presentan cuerpos de inclusión y por lo tanto sólo se pueden visualizar por medio de un microscopio electrónico. Entre ellos se encuentra el baculovirus no incluso de *Oryctes rhinocerus*.

A pesar de su éxito promisorio y atributos como plaguicidas, los virus han tenido un uso limitado y, sólo algunos productos comerciales se encuentran actualmente en el mercado, sobre todo a base de virus poliédricos (NPV), de la Familia Baculoviridae desarrollados para el control de algunos lepidópteros de la familia Noctuidae como *Helicoverpa zea*. (Echegoyén et al, 2004).

La mayoría de los productos comerciales pertenecen al grupo anteriormente mencionado, debido sobre todo a características como: especificidad a determinadas plagas, su infectividad, su alta virulencia, su compatibilidad con otras tácticas de control, su facilidad de producción, su estabilidad en almacenamiento y su seguridad (inocuo al hombre y otros animales) y no afectar el balance natural del agroecosistema. Dicho autor hace referencia a la familia Reoviridae como asociada a la patogenicidad en Coleóptera. (Cano et al, 2004 b)

### **2.2.8 Nemátodos**

Los nemátodos son gusanos cilíndricos, con cuerpos no segmentados, con una gruesa cutícula y epitelio sincitial, sin apéndices ni proboscis, la pared del cuerpo sólo con fibras musculares longitudinales. Su tamaño puede ser desde microscópica hasta un metro de longitud. Su ciclo de vida consta de 4 etapas larvales. Los géneros asociados a insectos pertenecen a la clase Secernentea y a la clase Adenophorea. (Hernández et al, 1982).

Para el caso específico de Scarabaeidae, se han reportado dos familias de nemátodos relacionados a su patogenicidad, Heterorhabditidae y Steinernematidae. (Cano et al, 2004b).

### 2.2.8.1 Importancia de la Familia Steinernematidae

Estos nemátodos tienen la capacidad de parasitar la mayoría de órdenes y familias de insectos, pueden ser cultivados en forma masiva, in vivo sobre los insectos hospedantes o “in vitro” sobre medios artificiales y, los estadíos infectivos (L3) pueden ser almacenados por mucho tiempo, conservando su capacidad infectiva. Están asociados simbióticamente a las bacterias del género *Xenorhabdus sp* que matan el hospedero en 24-48 horas por septicemia. Las especies más importantes y sus bacterias simbióticas son:

- *Steinernema carpocapsae* con *Xenorhabdus nematophilus*.
- *S. feltiae* con *X. bovienii*.
- *S. glaseri* con *X. poinarii*.

Los Steinernematidos han recibido mucha atención en control biológico debido a que poseen muchos de los atributos como agentes efectivos de control biológico de insectos. (Cano et al, 2004b)

### 2.2.8.2 Importancia de la Familia Heterorhabditidae.

Los nemátodos de esta familia han sido ampliamente investigados por la alta capacidad de control que tienen sobre “Gallina Ciega”, incluso tan efectivo como los plaguicidas químicos utilizados a la fecha. (Cano et al, 2004b)

#### Modo de acción

Los infectivos juveniles que en un momento determinado invaden el hemocele liberan la bacteria *Photorhabdus luminescens* que coloniza rápidamente al insecto, provocando muerte por septicemia dentro de un período de 48 horas. Estas bacterias y sus subproductos proveen al nemátodo los componentes necesarios para su desarrollo, mientras que este nemátodo actúa como vector permitiendo que la bacteria entre al insecto. (Cano et al, 2004b)

### **2.2.9 Hongos entomopatógenos.**

Son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros. Teniendo los mismos la particularidad de parasitar distintos tipos de artrópodos (Lecuona, 1996) así como diversos órdenes de la clase Insecta, entre los que se halla mas comúnmente: Heteróptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Orthóptera e Hymenóptera. (Echegoyén et al, 2004).

Sus epizootias ocurren frecuentemente en la naturaleza y, a menudo, causan reducciones significativas en poblaciones de insectos plaga. A pesar de conocerse alrededor de 100 especies de hongos con efectos insecticidas, solamente cerca de 20 especies han sido estudiadas como agentes de control y que, además, su desarrollo comercial ha sido lento. (Cano et al, 2004b)

## **2.3 GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.**

### **2.3.1 Clasificación taxonómica.**

De acuerdo a Ainsworth (1973), citado por Carreño (2003) y a Samson et al (1998), citado por Lecuona (1996), los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota, que tiene como características principales la no formación de plasmodios y ser frecuentemente miceliales. Dentro de esta división se hallan las subdivisiones siguientes: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina.

Los hongos entomopatógenos de mayor implementación en el control de plagas se hallan dentro de la subdivisión Deuteromycotina. Dentro de ésta, los entomopatógenos se encuentran en las clases Hyphomycetes y Coleomycetes Carreño (2003). Burge (1998) citado por Rendón (2001) igualmente menciona que los hongos entomopatógenos se hallan dentro de las clases Deuteromycetes y Entomophthoraceae.

### **2.3.2. Características de la subdivisión Deuteromycotina.**

Estos hongos son denominados también imperfectos, por carecer de fase sexual (o bien esta no es conocida) y reproducirse, por lo tanto, a través de conidios (Esporas asexuales). (Lecuona (1996); Carreño (2003))

Son similares a los estados conidiales de los Ascomycetes, por lo que, pueden ser considerados como pertenecientes a este grupo cuya fase sexual no evoluciono o que aun no ha sido descubierta (Lecuona, 1996).

En este sentido, Ainsworth 1973 citado por Carreño (2003), menciona que en una clasificación jerárquica, estos hongos no son iguales a los de las subdivisiones Ascomycotina y Basidiomycotina pero ambos son complementarios taxonómicamente y por nomenclatura.

### **2.3.3 Características de los Hyphomycetes.**

De acuerdo a Valiela (1979) citado por Carreño (2003), en este grupo las conidias no se forman ni en acérvulos ni en picnidios, sino que se originan en conidióforos libres o directamente en las hifas somáticas.

### **2.3.4 Especificidad de los hongos entomopatógenos en su ataque.**

Leyva e Ibarra (1992) citados por Rendón (2001), hacen referencia al hecho de que el conocimiento de la especificidad de un hongo entomopatógeno es un aspecto esencial que se debe determinar entre los mecanismos de selección de un hongo candidato para utilizarse como bioinsecticida; que existe diversidad de factores tanto intrínsecos como extrínsecos que pueden determinar la especificidad del ataque de los hongos entomopatógenos como la existencia de patotipos de una especie de hongos que aunque presentan morfología similar, tienen diferentes rangos de hospederos.

Vey *et al* (1982) y Glare (1992) citados por France *et al* (2004) describen que entre las variables que afectan la especificidad de algunos aislamientos de hongos entomopatógenos hacia un determinado hospedero, están la habilidad de las conidias para adherirse al tegumento y, una vez que el hongo ha penetrado en la cavidad corporal, su capacidad para producir toxinas.

Esta idea es apoyada por FUNICA (s.f.) quien manifiesta que la adhesión está determinada por la especificidad hospedante-patógeno. En dicho proceso, participan proteínas o glucoproteínas y mucopolisacáridos así como algunos lípidos.

Pardo y Puerta (1995), citados por Rendón (2001) señalan que en caso de ser efectiva la infección de un entomopatógeno a un hospedero susceptible, la sintomatología de la infección comenzará a percibirse de 4 a 5 días post-tratamiento.

### **2.3.5 Etapas de desarrollo de la infección por hongos entomopatógenos.**

El proceso de infección debido a estos hongos es descrito por Lecuona (1996), como sigue:

#### **2.3.5.1 Adhesión**

Es un fenómeno que permite la fijación de propágulos o unidades infectivas sobre el hospedante, en éste intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas entre el patógeno y el hospedante.

Dentro de este proceso se distinguen tres subetapas:

##### **a. Adsorción o inmovilización del microorganismo.**

Es una unión pasiva, donde intervienen factores físicos y químicos del sustrato como fuerzas de Van der Waals.

##### **b. Contacto.**

En esta etapa existe una interacción entre el patógeno y el hospedante en función de la capacidad del propágulo de emitir microextensiones activas que refuercen las uniones entre ambas superficies.

##### **c. Adhesión.**

Esta etapa puede ser pasiva y no específica, necesita de cofactores y de energía, iones, carbohidratos, lípidos, glucoproteínas, etc. Este es un paso importante en el desarrollo de una micosis, ya que, según algunos autores sólo las cepas virulentas tienen la capacidad de adherirse al tegumento del insecto; por esta razón, se ha correlacionado con la especificidad hospedante-patógeno. En este proceso pueden intervenir sustancias simples o complejas, que participan en la fijación del propágulo.

Se supone las conidias se adhieren, germinan y penetran mejor en las regiones intersegmentales del insecto hospedante, donde la composición y

estructura es sensiblemente diferente al resto del tegumento; pero esto no puede considerarse como regla general, aunque la existencia de estos sitios se confirma con análisis microscópicos realizados sobre los coleópteros *Oryctes rhinoceros* y *Cetonia aurata* L. parasitada por *M. anisopliae* y sobre *Ostrinia nubilalis* parasitada por *B. bassiana*.

#### **5.3.5.2 Germinación.**

Este proceso se lleva a cabo inmediatamente después de adherido e hidratado el conidio o espora sobre el tegumento, germina emitiendo un tubo germinativo, con formación algunas veces de un apresorio, que penetra posteriormente al insecto.

Los conidias de un hongo entomopatógeno, pueden presentar cuatro comportamientos germinativos sobre la cutícula del hospedante, detalladas a continuación:

- Emisión de un tubo germinativo.

Generalmente es corto y perfora el tegumento.

- Emisión de un tubo germinativo largo.

Presenta un comportamiento errante sobre la superficie y aparentemente no es capaz de penetrar a través del tegumento.

- Emisión de un tubo germinativo más o menos corto.

Posee una extremidad en la que crece un conidio secundario, de tamaño y forma diferente a la del primario.

- No puede germinar.

Durante el proceso germinativo, los factores climáticos juegan un papel importante, pero existen otros que no han sido bien estudiados y comprendidos como:

➤ Necesidad nutricional de las conidias, estas son diferentes según la especie fúngica o la cepa considerada. Algunas cepas pueden germinar sobre medios de cultivo simple, mientras que otras necesitan de medios de cultivos específicos.

➤ Especificidad parasitaria, el hecho de que una cepa germine sobre el tegumento de un insecto algunas veces se debe a esta especificidad, aunque

esto no puede ser generalizado, ya que esto depende de la relación hospedante-patógeno. Esto se debe a que la composición del tegumento del insecto varía dentro y entre las especies; y estas sustancias pueden influir en el estímulo requerido para la germinación.

➤ Microflora tegumentaria, esta puede favorecer la germinación de esporas y la adhesión, ya que se ha demostrado que la presencia de bacterias y hongos sobre la cutícula del coleóptero *Hylobius pales* inhibe la germinación de *M. anisopliae*.

### **2.3.5.3 Penetración.**

Está comprendida por una serie de transformaciones físicas y químicas, que se dan tanto a nivel de tegumento como a nivel del conidio; estas transformaciones permiten al patógeno penetrar la cutícula de su hospedante específico. Esta tiene lugar después de la germinación de esporas.

La penetración del hongo en la cutícula del hospedante implica una acción combinada de proceso físico y enzimático, es decir, que la acción enzimática permite que las hifas efectivas de los entomopatógenos penetren la cutícula del insecto.

Estas transformaciones provocan un estímulo para que exista la penetración del hongo en el hospedante, pero el paquete enzimático puede ser insuficiente, esto lo demuestran casos donde los conidios logran germinar sobre insectos que no son sus hospedantes, pero no logran penetrar y, por ende, no provocan mortalidad. Por otra parte, se puede decir que la secreción de enzimas, durante los primeros estados de desarrollo de un hongo, no siempre es condición para asegurar la penetración.

### **2.3.5.4 Multiplicación del hongo en el hemocele.**

Cuando el hongo ataca la cutícula y penetra, puede haber en ella reacciones de melanización en el punto de penetración y posteriormente alrededor de los elementos fúngicos. Estas reacciones pueden ser celulares o humorales, por mediación de células sanguíneas, sin embargo estas reacciones no siempre se dan.

Cuando el hongo ha penetrado al interior del insecto, éste inicia su multiplicación; principalmente por gemación, dando lugar a la formación de estructuras micelianas libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes. Además también se producen en el hemocele, hifas y protoplastos o células sin pared.

Los insectos poseen un sistema inmunológico que permite reaccionar a partículas extrañas dentro del hemocele, pero el principal mecanismo de defensa es la reacción celular o encapsulación, la cual se produce por la concentración de plasmatocitos o granulocitos alrededor del punto de infección, logrando formar la granuloma.

#### **2.3.5.5 Producción de toxinas.**

El término toxina se refiere a una sustancia venenosa producida por el organismo patógeno y, en ciertos casos, pueden provocar mortalidad en insectos, debido a sus propiedades insecticidas; pero además actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en las células de la hemolinfa. Cabe mencionar que no todos los hongos o todas las cepas de una misma especie producen toxinas en el hemocele, las cuales pueden ser de dos tipos: Macromoléculas proteicas y sustancias de bajo peso molecular.

#### **2.3.5.6 Muerte del insecto.**

La muerte de un insecto parasitado por un Deuteromycete ocurre generalmente, antes que el hongo colonice todo el interior del hemocele y es originada en parte, por la acción de sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte del hospedante marca el final de la vida parasitaria del hongo, ya que este sigue creciendo saprofiticamente, por todos los tejidos.

El tiempo que transcurre desde la infestación hasta la muerte del insecto depende de la cepa, hospedante y de los factores ambientales; observando cambios en su comportamiento normal antes de la muerte.

### **2.3.5.7 Colonización total.**

Este proceso sucede inmediatamente después de la muerte, el micelio invade todos los órganos y tejidos del insecto, algunas veces inicia por los tejidos grasos, aunque en algunos casos el hongo no llega a colonizar en algunos tejidos como glándulas de seda, músculos, tráqueas, etc. El cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana; esto se debe a la acción ejercida por los antibióticos liberados por el hongo.

Entre los antibióticos liberados por el hongo se encuentran:

- Oosporín, en *B. bassiana*.
- Cordycepín, en *Cordyceps militaris*.

Los cuerpos momificados de los hospedantes, sirven como reservorio del hongo para resistir las condiciones climáticas adversas.

### **2.3.5.8 Emergencia del hongo hacia el exterior.**

En esta etapa, el hongo se encuentra formando una gran masa miceliar en el interior del hospedante, manteniendo intacto el tegumento. Se puede mantener en esta forma si las condiciones de humedad relativa son bajas, en caso contrario, en ambientes húmedos y calidos; el hongo atravesará nuevamente el tegumento, pero esta vez del interior al exterior.

En los Entomophthorales, el micelio presente al interior del cadáver evoluciona dependiendo de las condiciones exteriores de forma especial, conidióforos darán conidios o esporas resistentes.

### **2.3.5.9 Esporulación.**

Una vez que las hifas atraviesan el tegumento, éstas pueden quedar en etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de 24 a 48 horas, con formación de conidios o esporas; si las condiciones de humedad relativa son altas. El insecto adquiere una coloración característica que dependerá de la especie de hongo que le provocó la micosis. Para el caso de insectos invadidos por *Beauveria sp* y *Verticillium sp* se tornará blanco, *Metarhizium sp*, verde oliva o ceniciento, *Paecilomyces sp* blanco amarillento, rosa o rojo.

### 2.3.5.10 Diseminación.

Este proceso se da, cuando los conidios o esporas formadas sobre el insecto se diseminan por acción del viento, agua, el hombre y otros organismos.

El esquema resumido del proceso del ciclo de la enfermedad fúngica se muestra en la figura 4.

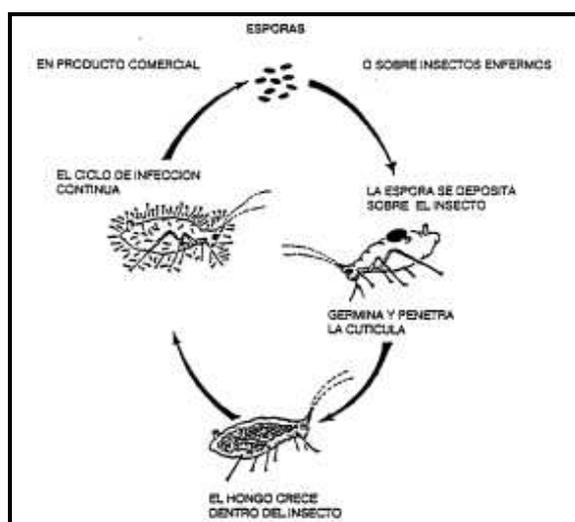


Figura 4. Ciclo de la enfermedad fúngica.

Tomado de Echegoyén et al. 2004. Manual técnico: Manejo integrado de plagas.

### 2.3.6 Condiciones favorables para su desarrollo.

Carruthers y Hural (1990) citados por De Faria (s.f.) mencionan que los hongos difieren de otros entomopatógenos en que, su modo de parasitismo y su sobrevivencia en el medio están fuertemente influenciados por las condiciones de los factores abióticos. Dicha característica de dependencia del microclima tiene mayor importancia en los procesos de formación, germinación y sobrevivencia de varios tipos de esporas infectivas (conidios) que atacan la cutícula del hospedero, germinan y subsecuentemente penetran la cutícula del mismo.

Ignoffo (1992), mencionado por la Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales (s.f.) señala, además, que el éxito de un entomopatógeno en el campo puede estar influenciado por una serie de factores abióticos, dentro de los

cuales se destacan la humedad ambiental y la radiación solar. La primera como requisito para la germinación de las conidias y la supervivencia de los hongos. Así, la sequía prolongada reduce la virulencia de muchos de ellos y puede anular su efecto controlador de plagas. En el caso de la segunda, se hace especial énfasis en aquellas longitudes de onda corta en el espectro de la luz ultravioleta, pues los inactivan, causando entre otros efectos la mortalidad de las esporas.

#### **2.3.6.1 Luz.**

Dentro de este aspecto, se considera que la radiación ultravioleta es la más perjudicial, ya que inhibe la germinación de los conidios. Tal es el caso de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, donde se ha demostrado que la exposición a la luz solar reduce la germinación y la cantidad de conidios, por otra parte, la luz solar es necesaria para obtener la esporulación de algunos hongos como *Paecilomyces farinosus* y *Cordyceps sp.* (Carballo, 1998)

#### **2.3.6.2 Humedad relativa (HR).**

La humedad es un factor determinante para la germinación de los conidios y otro tipo de esporas y la formación de estructuras reproductoras. Este factor también afecta la estabilidad y la sobrevivencia del hongo, las condiciones húmedas favorecen la presencia y persistencia de los hongos manifestándose como focos epizoóticos (Parada, 1999), ya que, generalmente requieren de alta humedad (más del 90% HR). Así por ejemplo, los conidios de *Metarhizium anisopliae* sobreviven mejor a humedades altas o extremadamente bajas. (Hernández et al, 1982).

Se considera que es un factor de poca importancia en el proceso de infección pero, indispensable en el proceso de germinación de conidios, además es importante en el proceso de desarrollo de las hifas y producción de esporas, lo cual resulta si la humedad esta cerca del 100%. (Parada, 1999).

#### **2.3.6.3 Temperatura.**

Este es un factor determinante para la germinación de los conidios e influye significativamente en la viabilidad de los mismos, ya que, para mantener niveles

adecuados se necesitan temperaturas más favorables (Carballo, 1998). La influencia de la temperatura en infecciones de insectos con *Beauveria sp*, depende de los requerimientos del hongo (Parada, 1999). Así, algunas variedades de *Beauveria bassiana*, germinan a temperaturas menores de 14° C pero, para el crecimiento de las hifas y micelios se requieren de temperaturas de 20 a 30° C. De igual manera, *Metarhizium anisopliae* para su germinación requiere temperaturas óptimas de 20 a 30° C.

## **2.4 PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.**

La producción de estos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un substrato natural. (FUNICA, s.f.)

La producción idónea de estos sólo se logrará a través de la implementación de métodos de producción que además de producir buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad.

### **2.4.1 Medios de cultivo utilizados en la producción masiva.**

Uno de los aspectos más fundamentales en la producción de hongos entomopatógenos es el tipo y composición del medio de cultivo, los cuales, determinan las características microbiológicas y la virulencia de la biomasa producida, es decir, su capacidad biocontroladora. (Caro et al, 2005)

#### **2.4.1.1 Medios nutrientes comerciales y artificiales.**

En cuanto a los medios de cultivo comerciales utilizados en algunas de las etapas de producción de los hongos entomopatógenos, se halla una verdadera diversidad de los mismos, de acuerdo a su naturaleza química, así tenemos: PDA (Papa, dextrosa y agar) y ADS (Agar dextrosa de Sabouraud), dentro de los medios más utilizados en alguna o algunas de las etapas de producción de los hongos. (Carreño, 2003; Bustillo et al, 2001; Rendón, 2001).

### **2.4.1.2 Sustratos sólidos (Naturales).**

Monzón (2001) citado por Carreño (2003) menciona que, hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya, pero los más utilizados son arroz y trigo. Caro et al (2005), Incluyen dos sustratos más que han sido utilizados en la producción de hongos entomopatógeno, mijo y la avena.

## **2.5 REACTIVACION DE LOS HONGOS.**

Este procedimiento es necesario para mantener las características de los aislados o cepas de hongos entomopatógenos, sobretodo aquellas relacionadas principalmente a su vigor de crecimiento y a su patogenicidad. FUNICA, (s.f.).

### **2.5.1. Reactivación “In Vivo”.**

El procedimiento habitual para el mantenimiento de la virulencia de los hongos se basa solamente a través de su inoculación y posterior aislamiento del insecto hospedero. (Ferron (1967) citado por la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (1986).

La oficina Cubana de la Propiedad Industrial (1986), citada por Carreño (2003) aclara que la frecuencia con que el aislamiento fúngico deberá ser reactivado dependerá de la cantidad de veces que un hongo en particular pueda ser multiplicado sin perder la virulencia contra el insecto plaga, aunque como regla general, se reactivará luego de cada 3 o 4 pases por medio nutriente comercial.

FUNICA (s.f.), menciona que la reactivación del hongo deberá ser realizada por lo menos dos veces al año. Esta regla general descansa en la amplia documentación acerca de la grave pérdida de virulencia de las cepas o aislados de hongos a través de pases sucesivos del mismo en el medio de cultivo. (Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, 1986; Bustillo et al, 2001)

De acuerdo a diversas investigaciones, la reactivación puede hacerse tanto en el mismo insecto que será controlado a través del hongo (Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales, s.f.; Rendón, 2001; FUNICA, s.f.), como en insectos hospederos que no son la plaga a controlar. (Arango Lopera et al, 2001).

### **2.5.2 Uso de medio de cultivo con potencial inductor de virulencia: Homogenizado de larvas.**

Ha sido documentado el mantenimiento e incluso incremento de la virulencia de los hongos entomopatógenos cuando al medio nutriente comercial o artificial son incorporadas mezclas de homogenizados del insecto plaga hospedero. (Bustillo et al, 2001; Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, 1986; Caro et al, 2005)

Bustillo et al (2001) sugiere que los elementos que permiten la acciones de penetración e invasión del hemocelo por parte de los hongos entomopatógenos sobre su hospedero se hallan en la cutícula del mismo. De esa manera, El Sufty (1983) citado por Bustillo et al (2001) reportó el incremento de los niveles de germinación, desarrollo micelial, producción de conidias y virulencia de *Beauveria bassiana* luego de la incorporación de cadáveres de insectos al medio de cultivo.

## 2.6 ALGUNOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS ASOCIADOS AL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS.

### 2.6.1. *Paecilomyces sp.*

El género *Paecilomyces sp* presenta hifas hialinas a amarillentas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. (Carreño, 2003). Ver figura 5.

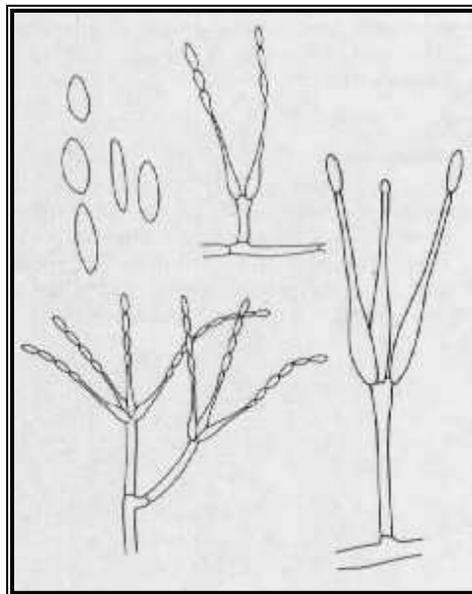


Figura 5. Esquema de conidióforos y conidias de *Paecilomyces sp*

Tomado de: Carreño, IA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero.

La especie más representativa dentro del género es *P. fumosoroseus*, y se caracteriza por que su colonia adquiere tonalidades rosadas, los conidióforos son erectos y llevan varias ramas compactas de fiálides cuyas bases están

fuertemente engrosadas y, sus conidios son desde cilíndricos a fusiformes y miden de 3-4 \* 1-2 micras de largo y diámetro. (Parada, 1999). Se detalla en la figura 6.



Figura 6. Microfotografía de conidias y conidióforo de *P. fumosoroseus*.

Tomado de: Carreño, IA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero.

### **2.6.2 *Beauveria* sp.**

Se caracterizan porque sus conidias se pueden producir directamente en el micelio o en las células esporogéneas separadas y pueden estar agrupadas en racimos o paquetes. Las especies más representativas son *B. brongniartii* y *B. bassiana*, que es el agente causal de la muscardina blanca en muchos insectos. El hongo invade al huésped a través de la cutícula o vía oral. Se puede, mencionar que más de 60 especies, en varios órdenes son susceptibles. Este hongo ha sido probado por su patogenicidad contra más insectos plagas que cualquiera otra especie de hongo (Lecuona, 1996).

Presenta unas estructuras que son visibles al microscopio llamadas fiálidas o células conidiógenas que tienen una base globosa en forma de botella y se extienden apicalmente en grupos densos. Estas fiálidas presentan un ráquiz que

es denticulado en zig-zag y se extiende apicalmente con un conidio por denticulo. El conidio es aseptado, globoso y menor a 3.5  $\mu$ m para *Beauveria bassiana*. (Cano et al, 2004 b), como se muestra en la figura 7.

El modo de acción del hongo se basa en su multiplicación en el interior del hospedero, hecho que conduce a la producción de hifas y blastosporas y a la producción de toxinas que en conjunto van a provocar la enfermedad y la muerte del insecto. Esta ocurre por la acción física del micelio mismo invadiendo los órganos y tejidos, comenzando por el tejido graso y también por la caída o desbalance de nutrientes y por la acción insecticida de los metabolitos tóxicos emitidos por el hongo, principalmente la Beauvericina. (Cano et al, 2004 b).



Figura 7. Microfotografía de conidias de *Beauveria bassiana*.

Tomado de: Carreño, IA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero.

Los insectos antes de sucumbir a la infección, exhiben varios síntomas como intranquilidad, cese de alimentación, pérdida de coordinación así como también cambios en la coloración del tegumento. Los insectos enfermos, generalmente, se mueven hacia lugares altos como la vegetación o si son subterráneos, hacia la superficie del suelo donde van a permanecer hasta su muerte y luego como

cadáveres adheridos a las hojas y ramas o sobre el suelo presentando los signos característicos. (Cano et al, 2004 b).

### **2.6.3 *Fusarium sp.***

Este género se halla dentro de los 100 entomopatógenos más importantes, junto a *Metarhizium sp*, *Beauveria sp* y *Paecilomyces sp* (France, 1999; Monzón, 2001). Diversas especies han sido relacionadas a la patogenia de insectos, así por ejemplo, *Fusarium coccophilum* y *Fusarium larvarum* han sido reportadas atacando exclusivamente Diaspididae (Homóptera), con una capacidad de control bastante eficaz sobre *Aonidiella aurantii* en los cultivos de cítricos en Suramérica, sobre todo en Brasil. De igual manera, menciona que el control que ejercen sobre las poblaciones depende en gran medida de las condiciones climáticas, pues requieren de una humedad relativa bastante alta para mantenerse en el ambiente. (García, s.f.)

Comercialmente, este género de hongos ha sido explotado y, han sido obtenidas formulaciones por parte de numerosos investigadores y empresas en forma de gránulos o polvo humedecible, a base de *F. oxysporum* y *F. moniliforme*; tal es el caso de la empresa italiana SIAPA, con su marca comercial Biofox C. (Fragas, s.f.). En el caso de “gallina ciega”, *F. oxysporium* ha sido reportado atacando el estadio larval. (Plagas importantes en el cultivo de piña, s.f.).

Una cepa de este hongo que fue identificada solamente a nivel de género, provoca una importante tasa de mortalidad sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* antes de que ésta logre penetrar la cereza y, por ende, causar el daño. (Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales, s.f.)

Pérez et al (1996), mencionado por la Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales (s.f.) incluye dentro de las características de este hongo la formación de micelio extenso y algodonoso, a menudo con un pigmento rosado, púrpura o amarillo que varía según la especie y medio de cultivo utilizado. Ver la figura 8.



Figura 8. Microfotografía de *Fusarium sp.*

Fotografía original de los autores.

Este género pertenece a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetos y se caracteriza por la formación de macroconidias, microconidias y en algunas especies por la producción de clamidosporas y micotoxinas.

#### **2.6.4 *Metarhizium sp.***

En este género, uno de los que tiene mayor importancia es el *M. anisopliae*. Se caracteriza por la formación de conidios sobre del esterigma. Este género presenta con frecuencia heterocariosis, por lo que, se da mucha variabilidad en cuanto a la virulencia de las variedades. Invade al huésped a través de la cutícula y vía bucal, la muerte del insecto se da por la pérdida de nutrientes y por la acción de las toxinas. (Lecuona, 1996).

*Metarhizium anisopliae* es el agente causal de la muscardina verde y es un patógeno de más de 300 especies de siete órdenes de insectos, siendo los Coleópteros los hospederos más comunes. Es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado en el control microbioal.

Las características morfológicas que presenta este hongo visto al microscopio, es que presenta células conidiógenas (fiálidas) de forma cilíndrica, con ápices redondeados o cónicos y están arreglados en densos himenios. Los conidióforos son ramificados repetidamente formando una estructura semejante a un

candelabro. Los conidios son aseptados, cilíndricos u ovoides, formando cadenas usualmente arregladas en columnas prismáticas o cilíndricas o en masas sólidas de cadenas paralelas. Su color varía entre el verde pálido o brillante a verde-amarillo u oliváceo. (Cano et al, 2004 b).

*M. anisopliae* var. *Anisopliae* presenta conidios cortos de 3.5 a 9 µm. El detalle de la estructuras se muestra en la figura 9.

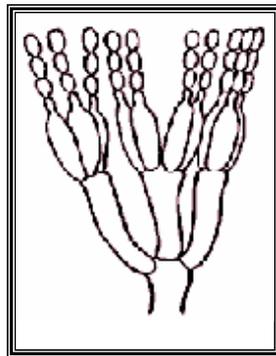


Figura 9. Detalle de las estructuras de *Metarhizium anisopliae*

Tomado de: Carreño, IA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero.

Los cadáveres de los insectos afectados, se observan completamente cubiertos con micelio del hongo de color blanco. Cuando el hongo esporula sobre el cadáver, adquiere una coloración verdosa. (Cano et al, 2004) b.

El modo de acción está relacionado con la acción física del micelio producido por la multiplicación del hongo en el interior del cuerpo del insecto que invade los órganos y tejidos, es muy importante la participación de las destruxinas que tienen una acción insecticida propia. El hospedero produce reacciones de defensa celular por ejemplo granulomas que son tejidos formados para rodear el micelio. Las toxinas producidas por el hongo erosionan estos granulomas y permiten a las blastosporas invadir el hemocele. Las toxinas también matan al hospedero al provocar una degradación progresiva de sus tejidos debido a la pérdida de integridad estructural de las membranas y la consecuente deshidratación de las células por pérdida de fluidos.

Los insectos afectados, comúnmente presentan cambios de conducta, principalmente en la alimentación, pérdida de coordinación y, movilización a partes altas de la planta en que se encuentran o movilización hacia la superficie del suelo en caso de insectos del suelo, así como cambios de coloración del tegumento o manchas en la piel. Después de morir, permanecen como cadáveres presentando los signos característicos como son crecimiento del hongo en las zonas intersegmentales del insecto y una coloración verde por efecto de la esporulación. (Cano et al, 2004 b)

Villani et al, 1992 citado por Parada (1999), menciona que “con este hongo pueden alcanzarse altos niveles de mortalidad de los insectos en el laboratorio, sin embargo, el control de poblaciones en campo es menos efectivo”.

#### **2.6.5. *Aspergillus* sp.**

Este hongo puede hallarse en distintos sustratos y como agente secundario dentro de un proceso de parasitismo, pues es común hallarlo sobre insectos moribundos o colonizados por otros patógenos. Pudiendo éste penetrar vía oral o espiráculos, (Lecuona, 1996). La especie *Aspergillus flavus* ha sido descrita atacando larvas de “cogollero del maíz”, *Spodoptera frugiperda*. (El Cogollero del maíz, s.f.). Lecuona (1996) reporta que “la especie *A. parasiticus* ataca a *Spodoptera frugiperda* y *A. flavus* parasita a *Tenebrio monitor*, *Trichoplusia ni* y varios órdenes de insectos”. La Agencia Universitaria de Periodismo Científico (s.f.), menciona que este género tiene capacidad de control sobre el gusano cachón de la yuca *Erinnyis ello*, pudiendo llegar a generar la muerte de los insectos en periodos tan cortos como 4 días hasta, tan largos como 190. Ver figura 10.

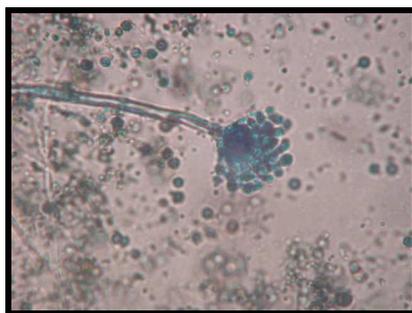


Figura 10. Microfotografía de *Aspergillus sp.*

Fotografía original de los autores.

## **2.7 CRITERIOS DE EVALUACION.**

### **2.7.1 Porcentaje de mortalidad.**

El porcentaje de mortalidad expresa la intensidad o grado de enfermedad, es decir, la respuesta de una población de insectos ante dos o más cepas o inóculos diferentes sobre dicho hospedante. (Lecuona, 1996).

### **2.7.2 Determinación de tiempo letal medio.**

Para evaluar la patogenicidad de un microorganismo y su virulencia, un parámetro que se determina es el tiempo letal medio; que se define como el tiempo necesario para matar el 50% de individuos o insectos a una dosis constante o determinada. (FAO, s.f.). Además, este parámetro mide la agresividad con que un patógeno o cepa virulenta mata un hospedante. Se expresa de la siguiente manera  $LT_{50}$  (Lecuona 1996).

### **2.7.3 Determinación de la capacidad de esporulación.**

Un criterio de evaluación de los hongos entomopatógenos es la capacidad de esporulación de un determinado aislamiento, una vez que ha muerto el insecto, ya que aquellas que producen mayor cantidad de esporas tendrán mayor capacidad de renovar el inóculo y controlar aquellos insectos que escaparon a la aplicación. Este es, sin duda, uno de los principales criterios ya que, cuanto mayor sea esta capacidad, mayor será la capacidad de control que tenga sobre la plaga, debido al efecto directo de la aplicación y la renovación del inóculo proveniente de la esporulación de los cadáveres. (France, 1999).

### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1. DURACION.

El estudio se realizó en el período de Agosto de 2005 a Febrero de 2006 y, consistió, en la evaluación de la patogenicidad de diez aislamientos de hongos nativos en el control de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).

El estudio comprendió 4 fases:

- **Fase Preexperimental.**
- **Fase Experimental.**
- **Montaje de de prueba de laboratorio.**
- **Fase de Procesamiento y Análisis de Resultados.**

#### 3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL.

##### 3.2.1 Aislamientos de hongos entomopatógenos.

Los aislamientos de hongos entomopatógenos utilizados en el estudio pertenecen a los géneros:

- *Fusarium sp* aislamiento 1.
- *Aspergillus sp.*
- Potrero 13, E.E.P. Muestra "G"<sup>1</sup>.
- *Gliocladium sp*
- Armando Arriaga<sup>1</sup>
- *Fusarium sp* aislamiento 2
- *Paecilomyces sp*
- *Beauveria bassiana*
- Hongo de Género no identificado de la micoteca de CENTA
- *Metarhizium anisopliae*

---

<sup>1</sup> No pudo ser determinado el género al que pertenecían estos aislados.

### **3.2.2 Larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).**

Se utilizaron larvas de gallina ciega del mismo estadio de desarrollo del orden Coleóptera de la Familia Scarabaeidae, dentro de la cual podrían existir varios géneros de acuerdo a la variabilidad de cada una de las localidades muestreadas.

### **3.3 FASE PRE-EXPERIMENTAL.**

Esta fase se llevó a cabo con la finalidad de adquirir las habilidades y destrezas necesarias para el manejo y manipulación adecuados de las larvas bajo las condiciones de laboratorio a las que éstas iban a ser sometidas en la realización de las pruebas de patogenicidad, así como también, para desarrollar capacidades en lo referente al trabajo manual tanto para el aislamiento como la reproducción de los hongos que pudieran hallarse en las larvas que resultaran enfermas en el transcurso de la investigación. De igual manera, esta fase sirvió para comenzar el desarrollo de destrezas en el trabajo que fue llevado a cabo en la multiplicación de los hongos conservados en refrigeración como resultado del trabajo conjunto realizado por el Grupo Centro de PROMIPAC<sup>1</sup>-El Salvador y la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador en los años 2003 y 2004. Las etapas que se desarrollaron en esta área fueron las siguientes.

#### **3.3.1. Fase de Campo.**

Esta actividad se realizó el 20 de junio de 2005, en la propiedad de Don Esteban Sandoval en el cantón El Transito I, caserío Los Quijanos en Tonacatepeque, Departamento de San Salvador a una altura de 598 m.s.n.m. Esta actividad consistió en la recolección de larvas de gallina ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) en un área total de media manzana, de una parcela cultivada con maíz. Las larvas se muestran en la figura 11. En este terreno desde hace 10 años no se realizan quemas. Según el propietario, la plaga en el lugar se presenta de forma regular todos los años principalmente entre los meses de mayo a noviembre. Por otra parte se observó que en él protegen el suelo con cobertura orgánica muerta

---

<sup>1</sup> Programa Manejo Integrado de Plagas con Productores de América Central

(rastreo) y al mismo tiempo con barreras vivas de zacate brizanta. La ubicación del área en la que se realizó esta etapa se muestra en el anexo 1.



Figura 11. Parte de las larvas de Scarabaeidae recolectadas en la localidad de Tonacatepeque (junio del 2005).

La metodología consistió en la búsqueda de larvas entre los 10 y 20 cm. de profundidad del suelo, utilizando instrumentos tales como azadón, palines de jardinería, rastrillos y pinzas para realizar un manejo adecuado de las mismas. Una vez extraídas del suelo, fueron colocadas en frascos individuales con una rodaja de zanahoria y una porción de suelo local. (Figura 12). Finalmente, el conjunto de larvas fue colocado en una hielera de 25 cuartos para la facilitación de su transporte. (Figura 13). Para cada localidad muestreada, se tomó registro de información importante en un formulario diseñado de manera apropiada para tal fin, la cual se muestra en el Anexo 2.



Figura 12. Aislamiento individual de larvas en frascos de 3 onzas (junio 2005).



Figura 13. Colocación de las larvas en hielera para su transporte (junio 2005)

### **3.3.2. Monitoreo de larvas.**

El monitoreo de larvas se hizo con el fin de determinar, si ellas estaban libres de enfermedades fúngicas o bacteriales y, en caso contrario, proceder al aislamiento del posible patógeno, preferentemente hongo, a través de las técnicas adecuadas. Fue llevada a cabo en el Laboratorio del departamento de Protección Vegetal (Lab. N<sub>o</sub> 3). Su duración fue de tres meses. Las larvas fueron clasificadas, según la longitud del cuerpo del insecto en grandes, entre 2 a 2.5 cm, medianas, de 1.5 a 2 cm y, pequeñas, menores de 1.5 cm. Cabe mencionar que algunas larvas fueron clasificadas como extrañas porque presentaron un comportamiento anormal, estas se mantuvieron confinadas para observar el posible apareamiento de una enfermedad. La revisión de las larvas se realizó una vez por semana, desde el 24 de Junio hasta el 8 de Septiembre. Esta actividad se hacía utilizando cucharas plásticas, pinzas, pinceles y, en cada ocasión, se les proveía de una rodaja fresca de zanahoria. En cada monitoreo se revisaron los aspectos siguientes: Comportamiento, Movilidad, Alimentación, Aspecto, Signos de enfermedades y Coloración. El formulario seguido para llevar registro de estos aspectos se muestra en el anexo 3.

### **3.3.3. Aislamiento de hongos de larvas enfermas.**

Las larvas afectadas por micosis se aislaron a través de la metodología descrita por FUNICA (s.f.) a través de diluciones seriadas, con el siguiente procedimiento:

1. La larva parasitada se lavó en una solución de Hipoclorito de sodio al 50% (Solución 1:1), utilizando la tapadera de una caja Petri, por un minuto. Esto se hizo con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes externos que la muestra pudiera traer consigo.
2. Luego, se la lavó en agua destilada estéril, en tres ocasiones consecutivas haciendo uso de tapaderas de cajas de Petri, para eliminar los restos de hipoclorito de Sodio de la muestra por aislarse.

3. La larva así tratada se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril al que fue agregada una gota de un agente tensoactivo común comercialmente conocido como tween 80 (Solución 1:10).
4. Utilizando una pipeta se tomó 1 ml de la solución 1:10, en la que se hallaba suspendida la larva, y se inoculó a otro tubo de agua destilada estéril (Solución 1:100) y así sucesivamente hasta llegar a la preparación de diluciones de 1:1000, 1:10000.
5. Las últimas dos diluciones se inocularon en cajas de Petri con medio de cultivo comercial PDA (Papa, dextrosa y agar), y se rastrearon con varillas de vidrio preparadas y esterilizadas.
6. Se esperó crecimiento.

La ilustración del procedimiento se muestra en la figura 14.

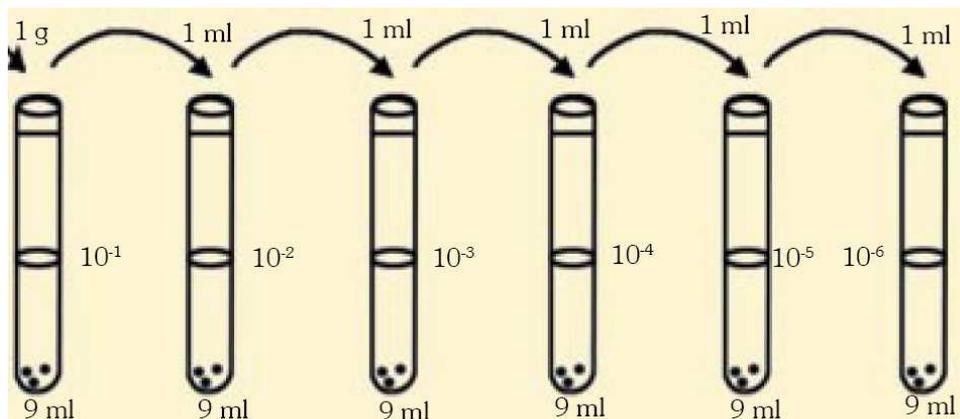


Figura 14. Esquema mostrando la forma de preparación de las diluciones seriadas para la obtención de los aislados de hongos

Tomado de: FUNICA. s.f. Producción y uso de hongos entomopatógenos

### 3.3.4 Reconocimiento taxonómico de adultos.

Para tener un acercamiento a taxonómico de los insectos que fueron recolectados en esta fase, se confinaron en frascos plásticos las larvas, con el objetivo de obtener una muestra representativa de la o las especies que se hallaban en la zona. El período aproximado que las larvas fueron confinadas fue de 74 días. Para identificar la o las especies que se hallaban dentro de las muestras de adultos así obtenidos, se contó con la colaboración del laboratorio de Entomología de la Universidad Técnica Latinoamericana, al facilitar el acceso a su colección

referencia de Scarabaeidae, en donde a través de un proceso de comparación con sus especímenes conservados se logró identificar los adultos obtenidos hasta el nivel de género<sup>1</sup>.

### **3.3.5 Percepción de la problemática por parte de los agricultores.**

Esta información se obtuvo por medio de formularios y entrevistas hechas a los productores de las áreas muestreadas.

La primer parcela muestreada pertenece a Don Esteban Sandoval, según el propietario, la plaga se presenta de forma regular todos los años principalmente entre los meses de mayo a noviembre. Pero el daño que provoca la plaga ha alcanzado hasta la tercera parte del cultivo de maíz; al realizar el muestreo se encontró un promedio de una larva por tres posturas. El productor utiliza para su control productos químicos (Volatón granulado). La segunda parcela, pertenece a Antonio González. El ataque de la oruga o gallina ciega en esta propiedad es severo, ya que el productor no utiliza ningún método de control. Y ha ocasionado serias perdidas económicas para el agricultor, cabe mencionar que para el año 2005, dicha plaga provocó perdida total en el cultivo de frijol y a menor escala en los cultivos de maicillo y maíz; siendo en este último donde menos pérdidas ocasionó. En el muestreo se observaron en promedio 2.1 larvas por postura. El tercer muestreo se realizó en la parcela propiedad de Don José María Jacobo, según el propietario dicha plaga se presenta de forma severa todos los años. Cabe mencionar que para su control utiliza productos químicos (como Counter) Según el propietario, este año la plaga ocasionó la pérdida de media manzana de maíz y tres tareas de maicillo. Se muestrearon 35 plantas de maicillo, en todas hubo presencia de la plaga recolectándose 273 larvas en total con un promedio 6.06 larvas por planta

Las personas propietarias de dichas parcelas se muestran en las figuras 15, 16 y 17.

---

<sup>1</sup> Para esta parte se contó con la colaboración del Ing. Agr. Leopoldo Serrano Cervantes, catedrático de la Universidad de El Salvador.



Figura 15. Entrevista al Señor Esteban Sandoval en que manifiesta la problemática de la “Gallina Ciega” en su parcela.



Figura 16. Entrevista a Don José María Jacobo en que manifiesta la problemática de la “Gallina Ciega” en su parcela.



Figura 17. Entrevista a Don Antonio González en que manifiesta la problemática de “Gallina Ciega” en su parcela.

### **3.4 FASE EXPERIMENTAL: PRIMERA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.**

#### **3.4.1 Fase de laboratorio.**

Esta subfase se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (Su ubicación se muestra en el anexo 1). En ella se llevaron a cabo las actividades descritas a continuación:

##### **3.4.1.1 Preparación de medios de cultivo.**

Se preparó medio de cultivo: PDA (Papa Dextrosa Agar). La composición se muestra en el cuadro 1 y su manera de preparación se muestra en el anexo 4. Una vez preparado y esterilizado el medio de cultivo, se procedió al llenado de cajas Petri de 6 y 12 centímetros de diámetro, que fueron identificadas y guardadas bajo refrigeración en bolsas plásticas transparentes de media arroba (12 libras).

Cuadro 1. Composición cuali-cuantitativa del medio de Cultivo PDA (papa dextrosa agar).

| <b>MEDIO DE CULTIVO PDA</b>   |                         |
|-------------------------------|-------------------------|
| <b>INGREDIENTE</b>            | <b>CANTIDAD(gr/lit)</b> |
| Infusión de papa<br>(Sólidos) | 4                       |
| Agar bacteriológico           | 15                      |
| Dextrosa                      | 20                      |

#### **3.4.1.2 Selección de aislamientos.**

Se seleccionó un total de seis aislamientos, dentro de los cuales, cuatro de ellos, procedían de la investigación realizada por el grupo Centro del Programa PROMIPAC-El Salvador, mantenidos en refrigeración en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador y otros dos aislamientos, que fueron obtenidos de larvas con micosis de la localidad del Cantón El Transito I, caserío Los Quijanos, Tonacatepeque, Departamento de San Salvador, aislados en la fase Preexperimental.

La codificación y otros datos de los aislamientos utilizados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Codificación de los aislamientos fúngicos usados en la primera prueba de patogenicidad.

| AISLAMIENTO   | ORIGEN GEOGRAFICO   | ESPECIE               | COLECTOR                                   | PROPIETARIO O ENCARGADO DE LA PARCELA                |
|---|---|-----------------------|--|--|
| <b>1. La Montaña, Borde Nim, Astoria* (16 de Julio de 2003)</b> | Crío Astoria, Ctón. Las Flores, Mpio. San Pedro Masahuat, Depto. La Paz         | <i>Fusarium sp</i>    | L. Serrano Cervantes, R. Iraheta Villatoro | Cooperativa Astoria                                  |
| <b>2. Armando Arriaga*</b>                                      | Crío. El molino, Ctn. San Ignacio, Mpio. San Ignacio, Depto. Chalatenango.      | n.i.                  | Martín Antonio Fuentes                     | Armando Arriaga                                      |
| <b>3. P.O.R.-2 (Potrero 13, E.E.P., L.S.C., Fac. CC.AA*</b>     | Ctn. Tecualhuya, Mpio. San Luis Talpa, Depto. La Paz                            | <i>Aspergillus sp</i> | L. Serrano Cervantes                       | Estación Experimental y de Prácticas. Fac. CC.AA/UES |
| <b>4. Potrero 13, E.E.P. Muestra "G"*</b>                       | Ctn. Tecualhuya, Mpio. San Luis Talpa, Depto. La Paz                            | n.i.                  | L. Serrano Cervantes                       | Estación Experimental y de Prácticas. Fac. CC.AA/UES |
| <b>5. L<sub>1</sub>G<sub>4</sub>**</b>                          | Cantón El Transito II, caserío Los Quijanos, Tonacatepeque, Depto. San Salvador | <i>Fusarium sp</i>    | Gabriela Mazariego                         | Esteban Sandoval                                     |
| <b>6. L<sub>1</sub>G<sub>105</sub>**</b>                        | Cantón El Transito II, caserío Los Quijanos, Tonacatepeque, Depto. San Salvador | <i>Gliocladium sp</i> | Oscar Sánchez                              | Esteban Sandoval                                     |

n.i.= No identificados al inicio de esta fase.

\*= Los adultos que habían sido criados e identificados en 2003, en las zonas de las que estos hongos procedían se ubican en los géneros *Anomala sp*, *Cyclocephala sp*, *Euphoria sp*, *Phileurus sp* y *Tomarus sp* (*Bothynus=Lygirus*) (Ávila et al, 2004).

\*\*= El reconocimiento taxonómico de los adultos correspondientes a este lote de larvas se obtuvo por comparación con especímenes de una colección de referencia de Scarabaeidae, conservada desde 2001 en la Universidad Técnica Latinoamericana (UTLA) de la Ciudad de Santa Tecla, en donde se tuvo acceso a dicha colección. Se determinaron los siguientes géneros de “Gallina Ciega”: *Tomarus sp*, *Euphoria sp* y *Anomala sp*.

### **3.4.1.3 Identificación de los aislamientos fúngicos utilizados en la primera prueba de patogenicidad.**

Una vez seleccionados los aislamientos que serían utilizados en la prueba de patogenicidad, se procedió a buscar posibilidades de identificación taxonómica de los mismos a través del uso del Diagnóstico a Distancia a través de Imágenes Digitales (DDDI<sup>1</sup>, por sus siglas en inglés) coordinado por la universidad de Georgia de los Estados Unidos de Norte América, por medio de la gestión de PROMIPAC-El Salvador; para lo cual, se prepararon algunas laminillas microscópicas de cada uno de los aislados de los cuales se tomaron fotografías y luego ellas fueron enviadas a través de Internet a la página de dicho servicio.

Para la identificación de los aislados se requirió, además de las fotografías, de la colaboración de personal técnico de PROMIPAC-El Salvador<sup>2</sup>, para hacer llegar tanto el resto de fotografías que se tenía de los aislados como las laminillas microscópicas a personal especializado en la taxonomía de hongos de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano.

---

<sup>1</sup> Distance Diagnostic by Digital Images

<sup>2</sup> Ing. Agr. Douglas González.

#### **3.4.1.4 Purificación de los aislamientos de hongos.**

La purificación de los cultivos de hongos consistió en obtener aislados libres de contaminantes, que pudieran ser usados posteriormente como patrones para la reproducción masiva de los mismos. Esta etapa se llevó a cabo desde mediados de Junio hasta inicios de Septiembre de 2005 y se realizó tomando una porción de inóculo de la caja de Petri conteniendo el hongo, el cual, era colocado en un tubo con 9 ml de agua destilada para posteriormente tomar 1 ml de dicha suspensión para ser inoculada y rastreada sobre una nueva caja de Petri con el medio de cultivo PDA; éstas eran revisadas cada 24 horas luego de la inoculación para proceder a la limpieza de cualquier contaminante que pudiera aparecer. Una vez obtenidos dichos cultivos puros se procedió a su repique en tubo de ensayo conteniendo, aproximadamente, 10 ml de medio de cultivo PDA.

#### **3.4.2 Fase de campo.**

Esta fase comprendió la recolección de una cantidad de larvas necesarias para la realización de los ensayos dentro de la investigación.

Se muestrearon dos zonas agrícolas del departamento de Ahuachapán en el Municipio del mismo nombre; la primera, con un área de media manzana y una altura de 630 m.s.n.m, propiedad de Don Antonio González el día 23 de Septiembre de 2005, en el cantón San Lázaro, en los caseríos La Labor y Pega-Pega, en la que había asocio de cultivos maíz-frijol. Las características de este lugar eran bastante particulares, puesto que, no había cobertura orgánica viva en el suelo, y presentaban anegamiento fuerte. El muestreo se hizo entre los 10 y 20 cm de profundidad. La segunda localidad muestreada, el día 29 de Septiembre de 2005, fue la propiedad de Don José María Jacobo en el cantón el Tigre Caserío los Horcones, a una altura de 640 m.s.n.m y un área total de 2 mz ( Equivalente a 16 tareas/mz), en el cual había establecido asocio de maíz-maicillo. En esta parcela no se realizan quemas de suelo desde hace ocho años; pero no realizan prácticas de conservación de suelo, y utilizan gallinaza cuando la planta de maíz mide aproximadamente 20 centímetros. Se encontraron larvas poco profundas,

entre 5-10 cm de profundidad. La ubicación de las dos zonas agrícolas se muestra en el anexo 1.

La búsqueda de insectos en los terrenos, se hizo a base de palas y palines de jardinería (Ver la figura 18), recolectando las larvas de manera individual, para evitar que se dañaran unas a otras, en frascos plásticos de 3 onzas de capacidad, con una pequeña cantidad de suelo local y, provistas de una porción de zanahoria sana con la cual se alimentaron. Dichos frascos fueron colocados en una hielera de 25 cuartos, para facilitar su manejo y transporte.



Figura 18. Parte de las herramientas y metodología usadas en la recolección de larvas de Scarabaeidae en los cantones San Lázaro y El Tigre, Ahuachapán septiembre del 2005.

El daño provocado al desarrollo de cultivos infestados por la presencia y abundancia de larvas de Scarabaeidae registradas en la segunda localidad muestreada se presentan en la figura 19 y figura 20, respectivamente.



Figura 19. Daño de “gallina ciega” caracterizado por el ataque de franjas dispersas en terreno cultivado con maíz-maicillo en el Cantón El Tigre, Ahuachapán septiembre del 2005.



Figura 20. Nivel de abundancia de larvas de Scarabaeidae alimentándose de las raíces de planta joven de maíz en el cantón El Tigre, Ahuachapán septiembre del 2005.

### **3.4.3 Observación cuarentenaria de las larvas recolectadas.**

Las larvas recolectadas fueron sometidas a un período cuarentenario en el cual se monitorearon con el fin de comprobar que no presentaran ninguna enfermedad causada por microorganismos ajenos al ensayo antes de ser inoculados con sus respectivos tratamientos; para que no pudieran alterar los resultados de la investigación.

El período de observación cuarentenaria fue, respectivamente, de 7 y 40 días, para los grupos de larvas recolectadas en el cantón San Lázaro (caseríos La Labor y Pega-Pega) y cantón el Tigre (Caserío Los Horcones).

El motivo por el cual hubo tanta diferencia en este período de observación es que, en el caso del primer grupo de larvas, éste fue utilizado en la prueba para la reactivación de la virulencia de los aislados fúngicos, al cual fue monitoreada, por cuatro semanas, la respuesta a la infección fúngica y, a partir de hongos aislados de larvas muertas del mismo, que serían reproducidos masivamente, se procedería a inocular las larvas del segundo grupo. Esto explica por qué no podría haberse dado la inoculación de las larvas en la misma fecha y, además, tanta diferencia de período de observación cuarentenaria entre ambos lotes de insectos.

### **3.4.4 Reactivación de los aislamientos de hongos.**

Una vez se contó con los aislamientos de los hongos en cultivos puros se procedió a la reactivación de los mismos a través de dos metodologías distintas.

#### **3.4.4.1. Reactivación “in vivo”.**

##### **3.4.4.1.1. Reproducción masiva.**

Se reprodujeron masivamente cinco aislamientos de hongos con los siguientes códigos:

- Potrero 13, E.E.P., muestra “G”.
- P.O.R. 2 (Potrero 13, E.E.P., L.S.C., Fac. CC.AA.)
- L1 G105

- Armando Arriaga
- La Montaña, borde nim, Astoria. (16 de julio de 2003).

Para la reproducción masiva de los diferentes aislamientos se procedió a cortar un trozo de inóculo puro del aislado creciendo en medio de cultivo PDA con el asa bacteriológica; éste fue introducido en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril más 1 gota de tween 80 para, finalmente, agitarlo por 1 minuto en vortex. De la solución así obtenida, con una pipeta estéril se tomó 1 ml de dicha solución que fue vertido en una caja Petri conteniendo medio de cultivo PDA. Dicho inóculo fue distribuido homogéneamente sobre la superficie del medio de cultivo por rastreo con varillas de vidrio dobladas (rastrillos), se identificaron y se sellaron con cinta parafilm para evitar la entrada de contaminantes. Para tener suficiente inóculo se procuró sembrar al menos 3 cajas Petri de cada aislado, que eran empaquetadas en páginas de papel periódico para, finalmente, ser colocadas en cajas organizadoras.

#### **3.4.4.1.2. Preparación de suspensiones.**

La fuente de inóculo para la preparación de las suspensiones fueron hongos con un promedio de 15 días de crecimiento en el medio de cultivo anteriormente mencionado. La metodología seguida consistió en rastrear en seco con el asa microbiológica en forma de “L”, el hongo que se hallaba en la superficie de la caja Petri, para posteriormente verter un poco de agua destilada estéril y proceder a un nuevo rastreado con el fin de extraer todas las esporas. Dicha mezcla fue vertida en un erlenmeyer de 250 ml para totalizar una suspensión de 100 ml, a la que fue adicionada una gota de tween 80 para desagregar las esporas del hongo; dicha solución se agitó finalmente por un período de un minuto. El procedimiento se ilustra en la figura 21.

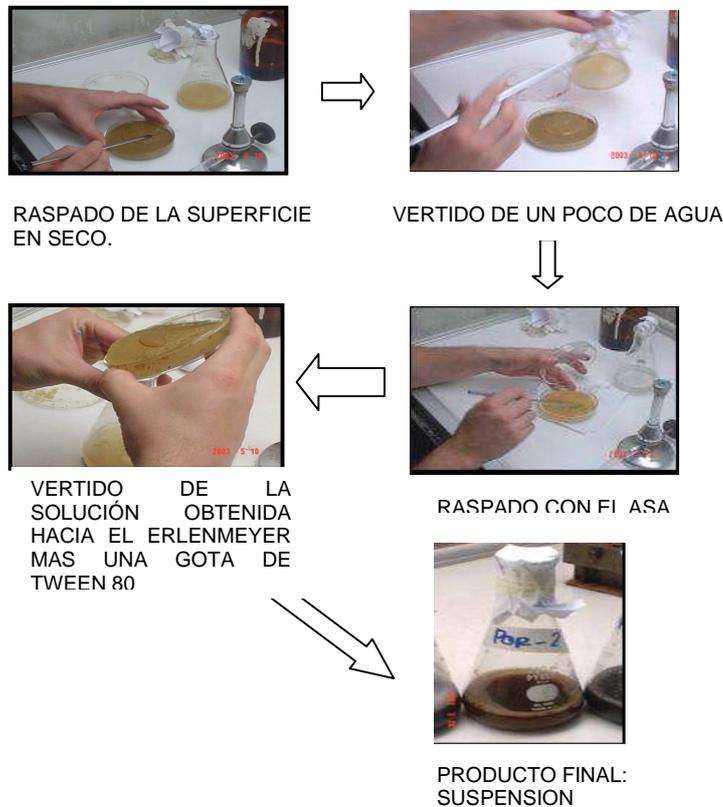


Figura 21. Metodología para la preparación de las suspensiones fúngicas

#### 3.4.4.1.3. Recuento de conidias.

La concentración de las suspensiones se determinó por medio de recuento de esporas en la cámara de Neubauer, cuyo esquema se puede ver en la figura 22. Para realizar el conteo de las mismas se procedió a tomar una pequeña muestra de la suspensión con una pipeta Pasteur, para colocar una gota en cada uno de los dos depósitos de la cámara. Se procedió a realizar el recuento de 5 cuadros de la cámara de Neubauer, los de los extremos derecho e izquierdo, tanto superior como inferior y el cuadro central. Las concentraciones logradas y utilizadas fueron de  $10^6$  conidias por mililitro.

La concentración de conidias de la suspensión se calculó de la siguiente manera:

$$NC = (SC / 5) * 50000$$

Donde:

NC= Número de conidias/ml de suspensión

SC= Sumatoria de las conidias contenidas en los cinco cuadros de lado de la cámara de Neubauer.

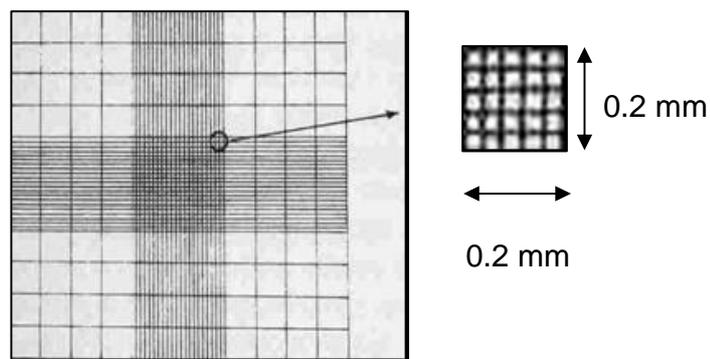


Figura 22. Esquema de la vista microscópica de la cámara de Neubauer y celda para conteo de conidias.

#### **3.4.4.1.4. Desinfección del sustrato. (Suelo)**

Este procedimiento se realizó con el fin de asegurarse de que la larva, en el caso de sufrir alguna enfermedad, se debiera los tratamientos aplicados y no por agentes contenidos en el sustrato mismo en que fueron confinadas. Esta actividad se llevó a cabo dentro de la misma semana en que las larvas fueron colocadas en sus respectivos frascos. El sustrato fue calentado en horno a una temperatura de aproximadamente 80° C durante 1 hora.

#### **3.4.4.1.5 Inoculación de larvas.**

La inoculación de larvas se realizó el día 30 de Septiembre de 2005, de acuerdo a la metodología descrita por Parada (1999) y Bustillo et al (2001), y consistió en la inmersión simultanea de tres larvas, que conformaban cada repetición, en las soluciones preparadas, durante 1 minuto, para colocarlas posteriormente en

frascos plásticos individuales de capacidad para tres onzas, con su respectiva identificación, alimento y sustrato; para esperar la respuesta del insecto a la inoculación. Dicho proceso de inoculación se muestra en la figura 23.

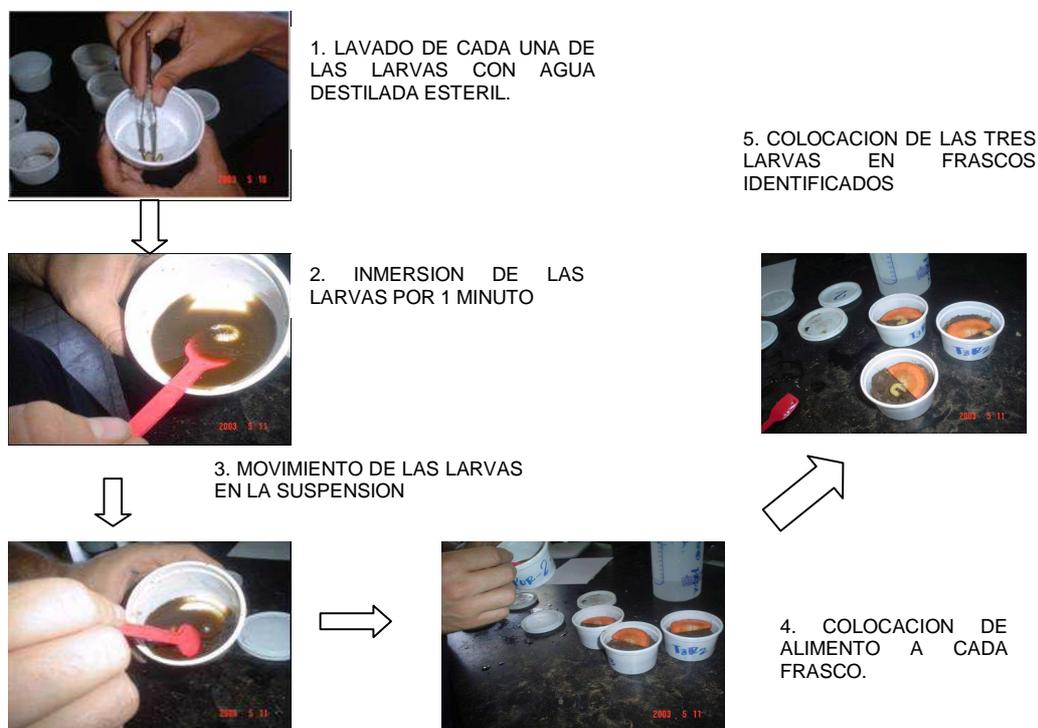


Figura 23. Metodología para la inoculación de las larvas de Scarabaeidae.

Como actividad complementaria para garantizar la humedad relativa adecuada del microambiente que es importante para el proceso de germinación de las conidias, se humedecieron los frascos, asperjando sobre el sustrato agua de grifo, de acuerdo a las necesidades observadas en el mismo.

El lote de larvas utilizada para este ensayo correspondió a los insectos recolectados en la propiedad de Don Antonio González el día 23 de Septiembre de 2005, en el cantón San Lázaro, del Municipio de Ahuachapán.

La manera en la que se preparó el ensayo era en base al diseño por bloques al azar y para ello se formaron tres bloques de acuerdo a la clasificación de las larvas por el largo corporal en tres tamaños: grandes, entre 2 a 2.5 cm, medianas,

de 1.5 a 2 cm y, pequeñas, menores de 1.5 cm; cada bloque contenía una repetición de cada uno de los tratamientos mencionados, así como también un tratamiento control a base de agua destilada estéril. Cada una de ellas (las repeticiones) estaba conformada por tres larvas de similar tamaño. Cada frasco fue tapado (figura 24) para conservar dentro de sí a una larva y evitar el ingreso de macroorganismos extraños a la prueba, o el escape posible de alguna larvas.

Posteriormente a la inoculación de todas las larvas, todos los frascos fueron colocados en un compartimiento dentro del Laboratorio del Departamento de Protección Vegetal (LAB. No. 3), de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, en el cual podrían contar con condiciones de oscuridad adecuada. La ubicación de la zona de trabajo se muestra en el anexo 1.

La manera en que el ensayo fue montado se presenta en la figura 24.



Figura 24. Frascos plásticos, tapados, utilizados para confinamiento de larvas de gallina ciega inoculadas con los aislados fúngicos.

#### **3.4.4.1.6. Monitoreo de respuesta a la inoculación.**

Esta actividad se realizó dos veces por semana durante cuatro semanas, la metodología utilizada consistió en revisar cuidadosamente cada larva, cambiándoles en cada revisión el alimento a base de zanahoria fresca. En dicha actividad se utilizaron pinzas, pinceles y cucharas plásticas.

En cada ocasión, se tomaron en cuenta en las larvas los siguientes criterios:

- Coloración
- Aspecto de la larva
- Alimentación
- Movilidad de la misma
- Comportamientos anormales
- Rapidez de aparecimiento de síntomas
- Cantidad de individuos muertos
- Porcentaje de mortalidad
- Signos

El formulario seguido para la valoración de estos datos se muestra en el anexo 3.

Las larvas que aparecieron muertas fueron colocadas en cámaras húmedas formadas por una caja Petri con el fondo preparado con una porción de papel filtro humedecido, para inducir, en caso de que la causa de muerte hubiera sido por micosis, la aparición de micelio y la esporulación del hongo. El proceso de revisión de las larvas inoculadas se muestra en la figura 25.



Figura 25. Procedimiento de revisión habitual de las larvas de Scarabaeidae inoculadas.

#### **3.4.4.2 Utilización de medio de cultivo suplementado con cutícula de insectos.**

Debido a los resultados obtenidos en la sección de reactivación “in vivo” de la virulencia de los aislados fúngicos, que es un factor clave en la realización de pruebas de patogenicidad a nivel de laboratorio; se procedió a realizar dicha actividad a través del crecimiento del hongo en el medio de cultivo comercial PDA suplementado con un potencial inductor de virulencia a base de un homogenizado de larvas de Scarabaeidae.

Para la reactivación del hongo a través de la utilización de cutículas de insectos en el medio de cultivo se siguió la metodología descrita por Bustillo et al (2001), realizando dos subcultivos de cada uno de los hongos a utilizarse, con una separación de tiempo de 13 días entre subcultivos. Es decir se sembró por primera vez en medio de cultivo con macerado de cutículas de insectos (Larvas de gallina Ciega) y trece días después se realizó el segundo subcultivo en el mismo medio tomando inóculo de dichos cultivos con 13 días de edad. Este hongo se dejó crecer por otros 12 días. Cumplido este período (En total cerca de 25 días, creciendo en medio de cultivo con cutículas de insecto) se procedió a preparar las suspensiones que serían utilizadas en el ensayo. El detalle de las etapas seguidas se presenta a continuación.

#### **3.4.4.2.1. Preparación del medio de cultivo.**

La preparación de medio de cultivo se hizo de acuerdo a la adaptación de la metodología descrita Bustillo et al (2001) y Carreño (2003), en ella se reunió una cantidad suficiente de larvas de Gallina Ciega, de la localidad de el cantón El Tigre caserío de Los Horcones el municipio de Ahuachapán, que fueron colocadas en congelador por un periodo de 5 minutos. Pasado ese tiempo les fue retirado la mayor cantidad posible de contenido corporal de las mismas, para proceder al macerado de casi exclusivamente la cutícula de las mismas, utilizando mortero y pistilo en una solución base de fosfato pH 7. La preparación de esta solución se muestra en el (anexo 5). De ese macerado se tomaron 0.5gr por cada 100 ml de medio de cultivo PDA, se mezcló bien para lograr la homogeneidad de la solución y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121<sup>0</sup> C y una presión de 15 lb/pulg<sup>2</sup> por un periodo de 15 minutos. El medio de cultivo fue vertido en cajas Petri de 6 y 12 cm.

#### **3.4.4.2.2. Reproducción masiva.**

Se reprodujeron masivamente cinco aislamientos de hongos<sup>1</sup>, codificados de la siguiente manera:

- Potrero 13, E.E.P., muestra "G".
- P.O.R. 2 (Potrero 13, E.E.P., L.S.C., Fac. CC.AA.)
- L1 G44
- Armando Arriaga
- La Montaña, borde Nim, Astoria. (16 de julio de 2003) Fusarium.

Para la reproducción masiva de los diferentes aislamientos se utilizó una metodología similar a la realizada en la sección **3.4.4.1.1**. La única diferencia radicó en la cantidad mínima de cajas cultivadas de cada hongo con las que se contó, que fue de 6.

---

<sup>1</sup> El aislamiento del hongo codificado como L<sub>1</sub>G<sub>105</sub> fue retirado por motivo de su pérdida por una fuerte contaminación sufrida en el mismo y fue sustituido por L<sub>1</sub>G<sub>44</sub>, que había sido purificado simultáneamente a los aislamientos utilizados.

### **3.4.5 Fase de montaje del ensayo.**

Esta fase fue llevada a cabo el día 8 de Noviembre de 2005, en el laboratorio del Departamento de Protección Vegetal (LAB. No. 3), de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (su ubicación se muestra en el anexo 1) Consistió en el establecimiento de la primera prueba de patogenicidad dentro de la investigación; en ella se realizaron las actividades siguientes:

#### **3.4.5.1 Desinfección del sustrato a utilizar. (suelo)**

Este procedimiento se realizó con el fin de asegurarse de que la larva, en caso de sufrir alguna enfermedad, fuera provocada por cualquiera de los cinco tratamientos fúngicos aplicados.

Esta actividad se llevó a cabo dentro de la misma semana en que las larvas fueron colocadas en sus respectivos frascos individuales. El procedimiento se realizó calentándose dicho sustrato en horno aproximadamente a 80° C de temperatura por un período de 1 hora.

#### **3.4.5.2 Preparación de suspensiones.**

Luego de haber sido realizada la reactivación de los aislamientos fúngicos a través de su crecimiento en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) suplementado con el potencial inductor de virulencia de homogenizado (macerado) de cutículas de insectos hospederos de interés: larvas de escarabajos de la familia Scarabaeidae, se procedió a la preparación de las suspensiones de los hongos que serían inoculadas a las larvas, para lo cual, se tomó como fuente de inóculo hongos de segundo subcultivo en dicho medio con 12 días de crecimiento<sup>1</sup>. La metodología llevada a cabo para la preparación de las suspensiones fue similar a la realizada en la sección **3.4.4.1.2**. Las suspensiones obtenidas de esa manera se muestran en la figura 26.

---

<sup>1</sup> En este momento cada uno de los aislamientos tenía un total de 25 días creciendo en medio de cultivo PDA suplementado con cutículas de larvas de Scarabaeidae.



Figura 26. Suspensiones fúngicas obtenidas para la inoculación de las larvas.

#### **3.4.5.3 Recuento de conidias.**

La concentración de las suspensiones se determinó a través de la metodología descrita en la sección **3.4.4.1.3**, por medio de recuento de esporas en la cámara de Neubauer. Las concentraciones logradas para todos los aislamientos fueron de  $10^7$  conidias por mililitro.

#### **3.4.5.4 Inoculación de larvas.**

El lote de larvas utilizado en este ensayo corresponde al de aquellas recolectadas en la segunda localidad muestreada, el día 29 de Septiembre de 2005, propiedad de Don José María Jacobo en el cantón el Tigre Caserío los Horcones del Municipio de Ahuachapán, del Departamento del mismo nombre.

Previamente, las larvas habían sido medidas en su ancho de cabeza, aplicando a los datos la regla de Dyar (anexo 8), mencionada por Wigglesworth (1974), para la uniformización del estadio de desarrollo de los insectos y, de esa manera, formar un diseño completamente al azar, con larvas cuyo ancho cefálico se hallaba en el rango de 2950.74 y 4098.25 micras (2.95 mm y 4.09 mm, respectivamente); con lo que se procedió a inocular las larvas indistintamente dentro de cada repetición. De acuerdo a un investigador entomólogo consultado por el aspecto que las larvas

tenían en las fotografías tomadas de las mismas, estas podían hallarse en el tercer estadio larval<sup>1</sup>.

La inoculación de larvas se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección **3.4.4.1.5**, hasta completar un total de 7 repeticiones, constando cada una de éstas, de 3 larvas inoculadas. El procedimiento de inoculación fue similar al esquematizado en la figura 23. De igual manera y, como actividad complementaria para garantizar la humedad relativa adecuada del microambiente y garantizar la germinación de las conidias en el cuerpo del hospedero, se humedeció el sustrato contenido en los frascos, asperjándolo con agua de grifo, de acuerdo a las necesidades observadas en el mismo.

#### **3.4.5.5 Monitoreo de respuesta a la inoculación.**

El monitoreo de la respuesta de las larvas a la inoculación por parte de los hongos se realizó dos veces por semana luego de la aplicación de los tratamientos y, se requirió de los siguientes materiales y equipos para su manipulación y revisión:

1. Pinceles.
2. Pinzas
3. Cucharitas desechables de plástico.
4. Estereoscopio

Los aspectos considerados en cada ocasión de revisión fueron los mismos detallados en la sección **3.4.4.1.6**.

Como actividad complementaria, se suministraba alimento fresco en cada una de las revisiones a los insectos, que como ya se mencionó estaba basada en trozos de zanahoria sana.

Para llevar un control adecuado del monitoreo de la respuesta del insecto a la inoculación, se llevó un registro fotográfico de cada evento, sin olvidar asociar la identificación respectiva de los individuos observados pues, en este estudio se pretendió determinar la sintomatología que presentó el insecto como efecto de la infección de los hongos. Para facilitar la recolección de la información de las larvas, se utilizó el formulario presentado en el anexo 3.

---

<sup>1</sup>Ing. Agr. Msc Mario Ernesto Parada Jaco, 20 de Diciembre de 2005, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). comunicación personal. Dirección de correo electrónico:

Aquellas larvas en las que su causa de muerte no estaba tan clara fueron colocadas en cámaras húmedas para tratar de inducir algún posible crecimiento fúngico en caso de que dicha muerte hubiera sido causada por micosis. Dichas cámaras consistieron en cajas de Petri con un disco de papel filtro húmedo. La duración total del monitoreo fue de cuatro semanas.

#### **3.4.6 Identificación de las especies de larvas recolectadas. (Gallinas Ciegas).**

Para la identificación de las especies predominantes en cada uno de los ensayos mencionados, es decir, para el ensayo de la reactivación “in vivo” y el correspondiente a las pruebas de patogenicidad propiamente dichas, se tomó una muestra de 10 insectos en estadio larvario de cada uno de ellos. Dichos insectos fueron identificados por la colaboración de un investigador entomólogo<sup>1</sup>, a través del estudio del arreglo espacial de las setas ubicadas ventralmente en el ráster de ellas.

### **3.5 FASE EXPERIMENTAL: SEGUNDA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.**

Esta fase tuvo lugar desde mediados del mes de Diciembre de 2005 hasta Febrero de 2006. En ella se utilizaron 4 aislamientos de hongos distintos a los evaluados en la primera prueba de patogenicidad, teniendo como motivo principal la baja o nula mortalidad causada por los aislamientos fúngicos utilizados en las etapas anteriores, sobre las larvas de “gallina ciega”. Las etapas seguidas en la misma se detallan a continuación.

#### **3.5.1 Fase de laboratorio.**

##### **3.5.1.1 Preparación del medio de cultivo.**

Buscando lograr mayor velocidad de crecimiento de los hongos a utilizarse en el ensayo, se preparó medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa de Sabouraud), cuya composición se muestra en el cuadro 3 y su forma de preparación se muestra en

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. Msc. Mario Ernesto Parada Jaco, 15 de enero de 2006, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Comunicación personal. Dirección de correo electrónico:

el anexo 6. Una vez llevado a punto de ebullición y esterilización, el medio de cultivo fue vertido en cajas de Petri de 6 y 12 cm. de diámetro. Dichas cajas fueron colocadas en bolsas de media arroba y mantenidas bajo refrigeración hasta el momento en que fueron utilizadas para la inoculación de los hongos seleccionados.

Cuadro 3. Composición cuali-cuantitativa del medio de cultivo ADS (Agar dextrosa de Sabouraud)

| <b>MEDIO DE CULTIVO ADS</b> |                         |
|-----------------------------|-------------------------|
| <b>INGREDIENTE</b>          | <b>CANTIDAD(gr./lt)</b> |
| Peptona bacteriológica      | 10                      |
| Agar                        | 15                      |
| Dextrosa                    | 40                      |

#### **3.5.1.2 Selección de aislamientos.**

Se seleccionó un total de cuatro aislamientos de hongos; dos de ellos procedían de la micoteca conservada bajo refrigeración a 4<sup>0</sup> C en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, mientras que, los dos restantes, procedían de la colección mantenida en CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal) en el laboratorio de Parasitología Vegetal. La descripción de algunas características importantes de ellos se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características de los aislamientos fúngicos seleccionados para la segunda prueba de patogenicidad.

| REFERENCIA                              | ESPECIE                       | HOSPEDERO                 | REACTIVO      | ORIGEN GEOGRAFICO |
|---|-------------------------------|---------------------------|---------------|-------------------|
| Bas 1 *                                 | <i>Beauveria bassiana</i>     | Broca de café             | Broca de café | El Salvador       |
| 1P*                                     | <i>Paecilomyces sp</i>        | Mosca blanca              | Mosca blanca  | El Salvador       |
| Potrero 13 a<br>E.E.P. Fac<br>CC. AA.** | Desconocida                   | Larvas de<br>Scarabaeidae | Desconocido   | El Salvador       |
| Metarhizium<br>G.H.***                  | <i>Metarhizium anisopliae</i> | Desconocido               | Desconocido   | Costa Rica        |

Observaciones especiales:

\*=El inóculo tomado en la investigación era hongo creciendo en el cuerpo infectado de dicha plaga que había sido sembrados en caja de Petri con medio de cultivo PDA y que estaban conservados en refrigeración en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

\*\*= Este hongo se hallaba en formulación lista para ser utilizado en control de plagas, conservado en refrigeración en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Vegetal del CENTA.

\*\*\*= Este hongo fue obtenido de la Micoteca del CENTA y, estaba conservado en tubo conteniendo medio de cultivo PDA.

### **3.5.1.3 Reproducción masiva de los hongos seleccionados.**

La reproducción masiva de los hongos entomopatógenos dio inicio en la tercera semana del mes de Diciembre de 2005 y, consistió de dos etapas.

#### **3.5.1.3.1 Crecimiento en medio de cultivo ADS.**

Esta etapa se realizó solamente con los dos aislamientos obtenidos de la micoteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador pues, como ya se especificó para los dos aislados de hongos del CENTA en el cuadro 4, se consideró que estaban en condiciones de ser utilizados directamente en la segunda etapa de la reproducción masiva de los hongos, que correspondió a la siembra de los aislados en arroz. La inoculación de aquellos aislamientos tomados de la micoteca de la Universidad de El Salvador fue realizada el día 20 diciembre de 2005 tomando un poco de inóculo de cada uno de ellos para ser colocado en un tubo con agua destilada estéril más una gota de dispersante, Tween 80. Esta mezcla fue homogenizada con ayuda de un Vortex por periodo de un minuto; pasado ese tiempo se tomó 0.1 ml de dicha solución para ser inoculada a una caja de Petri conteniendo medio de cultivo ADS. La solución inoculada fue homogenizada en toda la caja a través del rastreado con varillas de vidrio. Se procedió a sellar con cinta parafilm para evitar la entrada de agentes extraños, se empaquetaron con papel periódico, para protegerlas de la luz y se colocaron en cajas organizadoras de plástico, en estantería dentro de laboratorio. Los aislados ya crecidos en medio de cultivo ADS se pueden ver en la figura 27.



Figura 27. Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* sp.  
(Superiores e inferior, respectivamente)

#### 3.5.1.3.2 Crecimiento en sustrato sólido: arroz.

Esta actividad fue llevada a cabo el día 23 de Diciembre de 2005, con el apoyo tanto del personal del Laboratorio de Parasitología Vegetal del CENTA como del acceso al uso de sus instalaciones; para lo cual se procedió, en primer lugar, a tomar un poco de arroz no precocido tipo americano, a razón de 1 libra por cada cuatro erlenmeyer o frascos de bebidas rehidratantes que fueron preparados. Este arroz fue lavado dos veces. Luego de esas dos lavadas fue dejado “remojando” por espacio de media hora en una mezcla de agua de grifo más antibiótico Cloranfenicol, a razón de 250 mg por las 3 libras de arroz que fueron utilizadas. Una vez pasado ese lapso de tiempo, fueron llenados hasta cerca de la mitad de su capacidad, uno a uno los frascos antes mencionados y fueron cerrados con tapones de algodón de tamaño adecuado, para ser autoclavados por un periodo de 25 minutos bajo condiciones de temperatura y presión atmosférica de 121<sup>0</sup> C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>, respectivamente. La ubicación del Laboratorio de Parasitología Vegetal del CENTA, se muestra en el anexo 1.

Se enfriaron posteriormente y se golpeó suavemente la mezcla para que los granos de arroz no se compactaran, lo cual es indeseable para el crecimiento del hongo. Una vez estuvieron fríos y sueltos los granos de arroz contenidos en los frascos, se procedió a la inoculación de los hongos que se hallaban creciendo en

medio de cultivo comercial a cada uno de ellos<sup>1</sup>. Para lo cual fue tomada una porción del cultivo del hongo con todo y el medio de cultivo respectivo y fue introducido con cuidado en el frasco. Por otro lado, para el caso del hongo que se hallaba en formulación, simplemente se procedió al vertido de una pequeña cantidad del producto directamente en cada uno de los frascos en que crecerían. Debido a la poca cantidad de agua que contenía el sustrato y que es, un factor importante en el crecimiento del hongo en el mismo, les fue adicionada una pequeña cantidad de agua destilada estéril a aquellos frascos en los que se consideró necesario. Una vez inoculados todos los frascos fueron colocados en incubadora en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal a una temperatura de 22 a 24<sup>0</sup> C. El procedimiento de inoculación en el sustrato sólido de aquellos aislados crecían en medio de cultivo comercial se puede ver en la figura 28.

---

<sup>1</sup> Se hallaban creciendo en medio de cultivo comercial los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces sp*



a) Lavado del arroz, dos veces consecutivas.



b) Colocación de antibiótico Cloranfenicol y reposo por 30 minutos.



c) Vertido del arroz en frascos taponados con algodón.



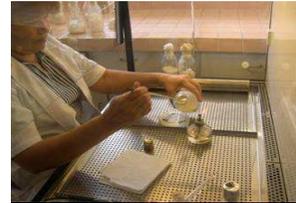
d) Esterilización por autoclave de los frascos con arroz.



e) Incorporación de agua destilada estéril a los frascos.



f) Toma de inculo del cultivo que se halla creciendo en ADS.



g) Inoculación de la porción de hongo en el frasco con arroz.



h) Aspecto de los frascos ya sellados con papel aluminio y algodón.

Figura 28. Metodología para la inoculación de los hongos entomopatógenos en sustrato sólido (arroz).

### 3.5.1.3.3 Cosecha del producto fúngico.

Esta actividad no se realizó, debido al lento crecimiento de los hongos y problemas debidos a otros factores como la contaminación bacteriana a pesar de que se habían tratado los granos de arroz con antibiótico Cloranfenicol.

### 3.5.2 Fase de campo.

Esta fase consistió en la recolección de material suficiente de larvas para la realización de la prueba de patogenicidad respectiva y fue realizada en la propiedad de Don José María Jacobo en el cantón el Tigre Caserío Los Horcones, de Ahuachapán en Diciembre del 2005 en donde se había establecido un cultivo de maicillo. Este lugar fue seleccionado nuevamente para la búsqueda de larvas puesto que, ya se tenía el antecedente de la fase de campo de la primera prueba de patogenicidad en la que, no fue determinada la existencia de agentes patógenos a las larvas luego de realizarse poco más de un mes de monitoreo en larvas procedentes del lote en esa ocasión recolectado. La ubicación del área de muestreo mencionada se muestra en el anexo 1. El daño causado por la plaga en el cultivo de maicillo establecido al momento de realizarse el muestreo para la búsqueda de larvas se muestra en la figura 29.



Figura 29. Daño causado por larvas de Scarabaeidae en franjas en un cultivo de maicillo en el Cantón El Tigre, Ahuachapán Diciembre del 2005.

Nótese las plantas sanas al fondo y el área sin plantas o con escaso desarrollo en la franja infestada en el terreno.

Las recolecciones fueron realizadas los días 19 y 22 de Diciembre de 2005. Sin embargo, debido a las condiciones de humedad bastante bajas del terreno en tal época, la metodología de ubicación, extracción y recolección de las larvas fue más difícil que en las etapas anteriores de la investigación. Fue necesario utilizar piochas, para extraer bloques completos de suelo, los cuales eran golpeados con cuidado para destruir las cámaras en las que los insectos se encontraban. Esta diferencia de metodología en la recolección con mayor traumatismo para las larvas se muestra en la figura 30.



a. Metodología para la ubicación, extracción y recolección de larvas de Scarabaeidae en cámaras.

b. Larva en cámara para el período seco.

Figura 30. Metodología utilizada para la recolección de larvas de Scarabaeidae en el período de época seca en el Cantón El Tigre, Ahuachapán Diciembre del 2005.

Una vez extraídas de las cámaras fueron colocadas en frascos plásticos de 3 onzas de capacidad de manera individual a los que fue colocada una pequeña cantidad de suelo local, así como una pequeña cantidad de agua para disminuir, en alguna medida, el estrés de las larvas. Una vez movilizadas las larvas al lugar donde se iban a tener los frascos se les proporcionó alimento lo más pronto posible. Su alimentación estuvo basada siempre de trozos de zanahoria fresca.

### **3.5.3 Monitoreo de las larvas.**

Esta actividad fue realizada desde el 19 y 22 de Diciembre de 2005 hasta el 31 de enero de 2006 y sirvió para verificar la ausencia de agentes patógenos externos al ensayo así como también para realizar el descarte de aquellos insectos muertos por el manejo a que fueron sometidos, sobre todo por la metodología de extracción utilizada.

### **3.5.5 Fase de montaje del ensayo.**

Esta fase fue llevada a cabo el día 31 de enero de 2006, en el laboratorio del Departamento de Protección Vegetal (LAB. No. 3), de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (Su ubicación se muestra en el anexo 1. Consistió en el establecimiento de la segunda prueba de patogenicidad dentro de la investigación; en ella se realizaron las actividades siguientes:

#### **3.5.5.1. Desinfección del sustrato a utilizar.**

Este procedimiento se realizó con el fin de asegurarse de que la larva, en caso de sufrir alguna enfermedad, fuera provocada por cualquiera de los cinco tratamientos fúngicos aplicados.

Esta actividad se llevó a cabo dentro de la misma semana en que las larvas fueron colocadas en sus respectivos frascos individuales. El procedimiento se realizó calentándose dicho sustrato en horno aproximadamente a 30° C de temperatura por un período de 1 hora.

#### **3.5.5.2 Preparación de suspensiones.**

Como se mencionó en la sección **3.5.1.3.3**, la cosecha de los hongos que habían sido cultivados en arroz, de los que se pretendía obtener el inóculo para la preparación de las suspensiones, no fue realizada debido a diversos factores que hicieron imposible la obtención, ya sea de una cantidad o calidad adecuada de producto fúngico. Por esta razón, se decidió tomar como fuente de inóculo para la preparación de las suspensiones aquellos hongos cultivados en cajas de Petri con medio de cultivo ADS, de 42 días de edad y que, fueron aquellos tomados de la micoteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, pertenecientes de los géneros

*Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* sp. La metodología llevada a cabo fue similar a la realizada en la sección **3.4.4.1.2**.

#### **3.5.5.3 Recuento de conidias.**

La concentración de las suspensiones se determinó a través de la metodología descrita en la sección **3.4.4.1.3**, por medio de recuento de esporas en la cámara de Neubauer. Las concentraciones logradas para todos los aislamientos fueron de  $10^6$  conidias por mililitro.

#### **3.5.5.4 Inoculación de larvas.**

Esta actividad fue realizada el día 31 de enero de 2006 y el lote de larvas utilizado en esta segunda prueba de patogenicidad corresponde al de aquellas recolectadas en la localidad muestreada los días 19 y 22 de Diciembre de 2005, propiedad de Don José María Jacobo en el cantón El Tigre Caserío Los Horcones del Municipio de Ahuachapán en el Departamento del mismo nombre.

Previamente, las larvas habían sido medidas en su ancho de cabeza, se aplicó la regla de Dyar (anexo 8), mencionada por Wigglesworth (1974), para la uniformización del estadio de desarrollo de los animales, con medidas de ancho de cabeza de 6229.34 micras y 4426.11 micras (6.22 mm y 4.42 mm, respectivamente) y, de esa manera, formar un diseño completamente al azar; con lo que se procedió a inocular las larvas indistintamente dentro de cada repetición.

La inoculación de larvas se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección **3.4.4.1.5**, hasta completar un total de 4 repeticiones, constanding cada una de éstas, de 3 larvas inoculadas. El procedimiento de inoculación fue similar al esquematizado en la figura 23. De igual manera y, como actividad complementaria para garantizar la humedad relativa adecuada del microambiente y garantizar la germinación de las conidias en el cuerpo de las larvas, se humedeció el sustrato contenido en los frascos, asperjándolo con agua de grifo, de acuerdo a las necesidades observadas en el mismo.

### **3.5.5.5 Monitoreo de respuesta a la inoculación.**

El monitoreo de la respuesta de las larvas a la inoculación por parte de los hongos se realizó una vez por semana luego de la aplicación de los tratamientos.

Los aspectos considerados en cada ocasión de revisión fueron los mismos detallados en la sección **3.4.4.1.6** y, como actividad complementaria, se suministraba alimento fresco en cada una de las revisiones a los insectos, basada en trozos de zanahoria fresca. Para facilitar la recolección de la información de las larvas, se utilizó el formulario presentado en el anexo 3.

La duración total del monitoreo fue de 21 días.

## **3.6. METODOLOGIA ESTADISTICA.**

### **3.6.1. Factores en estudio.**

Los factores en estudio para la investigación fueron cada uno de los aislamientos fúngicos, así, para la primera prueba de patogenicidad, hubieron cinco aislamientos de hongos nativos pertenecientes a los géneros *Fusarium sp* aislamiento 1, *Fusarium sp* aislamiento 2, *Aspergillus sp*, Potrero 13 E.E.P. muestra "G"<sup>1</sup>, Armando Arriaga<sup>1</sup>, mientras que, para la segunda prueba de patogenicidad correspondieron a los aislados de los géneros *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces sp*.

### **3.6.2. Descripción de tratamientos.**

Los seis tratamientos utilizados en la primera prueba de patogenicidad fueron: cinco aislamientos de hongos nativos que han sido aislados de larvas de gallina ciega (Coleóptera; Scarabaeidae), y un testigo que fue a base de agua destilada estéril. Los seis tratamientos se especifican en el cuadro 5.

---

<sup>1</sup> Estos aislamientos aún no han sido identificados ni a nivel de género, por lo que, se identifican mediante su codificación en el laboratorio.

Cuadro 5. Tratamientos utilizados en la primera prueba de patogenicidad.

| NUMERO | TRATAMIENTO    | ESPECIE                                | CODIFICACION  | ESPECIFICACION                 |
|--------|----------------|--|---|--------------------------------|
| 1      | T <sub>0</sub> | Testigo                                | -   | agua destilada estéril         |
| 2      | T <sub>1</sub> | <i>Fusarium</i><br><i>sp</i> **        | L <sub>1</sub> G <sub>44</sub>                                    | 10 <sup>7</sup> conidias/ ml*  |
| 3      | T <sub>2</sub> | <i>Fusarium</i><br><i>sp</i> ***       | La Montaña,<br>Borde Nim,<br>Astoria*<br>(16 de Julio de<br>2003) | 10 <sup>7</sup> conidias/ ml * |
| 4      | T <sub>3</sub> | <i>Aspergillus</i><br><i>sp</i>        | P.O.R.-2<br>(Potrero 13,<br>E.E.P., L.S.C.,<br>Fac. CC.AA*        | 10 <sup>7</sup> conidias/ ml * |
| 5      | T <sub>4</sub> | Potrero 13<br>E.E.P.<br>muestra<br>"G" | Potrero 13,<br>E.E.P.<br>Muestra "G"*                             | 10 <sup>7</sup> conidias/ ml * |
| 6      | T <sub>5</sub> | Armando<br>Arriaga                     | Armando<br>Arriaga  | 10 <sup>7</sup> conidias/ ml * |

\*=Todas las soluciones tuvieron una concentración de 10<sup>7</sup> conidias por mililitro.

\*\*= Aislado número 1.

\*\*\*= Aislado número 2.

Los tratamientos utilizados en la segunda prueba de patogenicidad se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos utilizados en la segunda prueba de patogenicidad.

| NUMERO | TRATAMIENTO | ESPECIE                   | CODIFICACION | ESPECIFICACION               |
|--------|-------------|---------------------------|--------------|------------------------------|
| 1      | T0          | Testigo                   | -            | Agua destilada estéril       |
| 2      | T1          | <i>Beauveria bassiana</i> | BAS 1        | 10 <sup>6</sup> conidias/ ml |
| 3      | T2          | <i>Paecilomyces sp</i>    | 1P           | 10 <sup>6</sup> conidias/ ml |

### 3.6.3. Diseño y modelo estadístico.

El diseño estadístico que se utilizó en el desarrollo tanto de la primera como la segunda prueba de patogenicidad fue el diseño completamente al azar bajo la modalidad de grupos, utilizando seis tratamientos y siete repeticiones, para la primera prueba y, tres tratamientos y cuatro repeticiones, para la segunda. Cada una de las repeticiones estuvo conformada por 3 larvas, requiriéndose un total de 126 y 36 larvas, respectivamente de las pruebas mencionadas. La distribución espacial de los tratamientos en el laboratorio se muestra en el anexo 7.

Se empleó ese diseño estadístico, ya que, la variabilidad de las condiciones en el laboratorio fueron relativamente pequeñas y, las larvas que se utilizaron fueron uniformizadas en su estadio de desarrollo por el ancho de la cabeza, de acuerdo a la regla de Dyar, mencionada por Wigglesworth (1974) y, además, se trató de controlar todas aquellas condiciones que puedan influir en el experimento, tales como la humedad y factores de iluminación, principalmente; por lo cual, se estableció como única diferencia en el efecto sobre las larvas los siete aislamientos de hongos más el testigo utilizado. La manera en la que se utilizó la regla de Dyar en la investigación, que se muestra en el anexo 8.

El Modelo estadístico se definió con la siguiente fórmula:

$$Y_{ij} = \mu + \tilde{I}_i + \Sigma_{ij}.$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Característica bajo estudio observado en la parcela J donde se aplico el tratamiento i.

$\mu$ = Media Experimental.

$\tilde{I}_i$ = Efecto del aislamiento i.

$\Sigma_{ij}$ = Error experimental de la celda (i, j).

i= 1, 2,3.....,a; número de tratamientos.

J= 1, 2,3.....,a; número de repeticiones de cada tratamiento.

#### **3.6.4 Distribución estadística.**

La distribución estadística se realizará solamente a los datos obtenidos en los primeros 21 días después de inoculación, ya que, se considera en la práctica, como un período máximo en el que puede verificarse la mortalidad de larvas por hongos en el ensayo, según el criterio de un investigador consultado<sup>1</sup>. La distribución estadística se muestra en el cuadro 7.

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. Msc. Mario Ernesto Parada Jaco, 15 de Enero del 2006, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Comunicación personal.

Cuadro 7. Distribución estadística utilizada en las dos pruebas de patogenicidad realizadas en la investigación.

| <b>FUENTES DE VARIACION</b> | <b>G.L.</b> | <b>S.C.</b>                        | <b>C.M.</b>                  | <b>F calc.</b>            |
|-----------------------------|-------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <b>Tratamiento</b>          | $a-1=5$     | $1/n \sum y_i - y...2/na$          | $Sc \text{ trat}/a-1$        | $C.M. \text{ trat}/C.M.E$ |
| <b>Error experimental</b>   | $a(n-1)=36$ | $SC \text{ total}-SC \text{ trat}$ | $SC \text{ errorexp}/a(n-1)$ |                           |
| <b>Total</b>                | $An-1=41$   |                                    |                              |                           |

$y_i$ = Representa el total para el tratamiento  $i$ .

$y_{..}$ = Representa el gran total.

### 3.6.5 Hipótesis estadística.

Por no haberse encontrado referencia bibliográfica, al menos, de los tres géneros conocidos hasta el momento en la investigación sobre su comportamiento patogénico para el control de gallina ciega (Coleóptera; Scarabaeidae); las hipótesis estadísticas fueron las siguientes:

$H_0$ = Al evaluar los seis aislamientos de hongos, se espera que todos los tratamientos tengan igual patogenicidad en el control de "Gallina Ciega" (Coleóptera: Scarabaeidae).

$H_1$ = Al evaluar los seis aislamientos de hongos, se espera que al menos dos de ellos posean mayor patogenicidad en el control de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).

### **3.6.6. Variables evaluadas.**

Para medir el efecto de los seis aislamientos para el control gallina ciega, se tomarán los siguientes criterios:

#### **3.6.6.1 Variables cuantitativas.**

- Rapidez de apareamiento de síntomas, considerando los días que pasaban desde que los hongos eran inoculados hasta que se percibía cambios en los insectos.
- Cantidad de individuos muertos.
- Porcentaje de mortalidad

#### **3.6.6.2. Variables Cualitativas.**

- Aspecto de la larva, referido sobretodo a la morfología normal o anormal que la larva pudiera tener.
- Movilidad, puesto que, los insectos afectados tienden a ir reduciendo su movilidad a medida que la infección fúngica va avanzando.
- Comportamiento, entendiéndose como movimientos erráticos, tendencia a no esconderse y apareamiento en la superficie de los frascos utilizados para confinamiento.
- Signos, es decir, el apareamiento de estructuras fúngicas en el cuerpo del animal, luego de su muerte.
- Coloración, esperando que la larva pudiera tener algunos cambios de color en su cutícula debido a la acción de penetración de las estructuras del hongo.
- Alimentación, por que se dice, en términos generales que los insectos afectados por micosis tienden a ir reduciendo su alimentación a medida que la infección fúngica se va desarrollando.

### 3.6.7 Prueba estadística.

Para comparar la diferencia que existió entre los tratamientos en estudio, se decidió la utilización, en caso de ser necesaria, de la prueba de diferencia mínima significativa (DMS); con la finalidad de conocer si existe diferencia estadística entre los aislamientos estudiados o, si su comportamiento es similar y, con base en ello hacer recomendaciones sobre el o los aislamientos de mayor patogenicidad. Se eligió esta prueba, ya que, no existen estudios anteriores que comparen los aislamientos en utilizados en la investigación y por que también, el número de tratamientos es pequeño.

La prueba estadística queda definida de la siguiente manera:

$$D.M.S = T_{\alpha, a (N-1) G.L.} * ETD$$

Donde:

$T_{\alpha, a (N-1)}$  es el valor de "t" dado por la tabla de "t" de Student, el cual depende del  $\alpha$  y los grados de libertad del error experimental.

ETD= Error típico de la diferencia entre medias de tratamientos y está dado por la siguiente expresión.

$$S_{\bar{d}} = \sqrt{(CME * 2/n)}.$$

Donde:

CME= varianza del experimento.

n=Numero de repeticiones.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 FASE PREEXPERIMENTAL.

En esta fase se adquirieron habilidades y destrezas en el manejo adecuado de larvas y reproducción, identificación y manejo de hongos.

#### 4.1.1 Fase de Campo.

En dicha actividad se colectaron larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae), el total recolectadas fue de 123 larvas. Dividiéndolas posteriormente su longitud, obteniéndose finalmente un total de 14 pequeñas, 12 medianas, 92 grandes y 5 extrañas.

En la figura 31, se puede observar que 92 larvas de la población correspondían a la clasificación de larvas grandes, es decir que posiblemente se encontraban en el estadio L3 de desarrollo. Y una cantidad menor de dicha población se encontró distribuida entre larvas pequeñas, que eran en total 14; medianas, 12; siendo las de menor presencia las clasificadas como extrañas encontrándose sólo 5 de la población total de larvas.

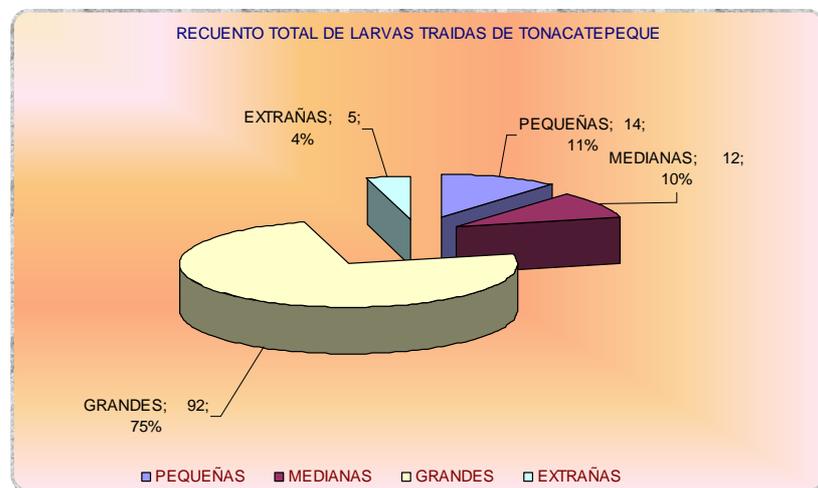


Figura 31. Porcentaje total de larvas de Scarabaeidae recolectadas en la localidad de Tonacatepeque el 20 de junio de 2005, en un cultivo de maíz.

#### 4.1.2 Monitoreo de larvas.

El monitoreo de larvas fue llevado a cabo desde el día 24 de Junio hasta el 3 de Septiembre de 2005. La figura 32, muestra que al realizar la segunda revisión, el primero de julio de 2005, se encontraron larvas con signos de enfermedad y aparecieron 16 larvas muerta cubierta por hongo; es decir un 13% de la población total recolectada. El número de larvas muertas aumentó en las siguientes revisiones. Manteniéndose un comportamiento similar para la tercera revisión, el 3 de julio de 2005, ya que hubo 15 larvas muertas por hongo, equivalente a un 12.19% de la población total de larvas recolectadas. Es decir, que se alcanzaron los más altos porcentajes de mortalidad en el segundo y tercer monitoreos; se redujo la mortalidad, en un 50%, para la siguiente revisión, comportándose de igual manera en las siguientes revisiones. Obteniéndose finalmente el 36.53% de la población total de insectos muertos por infecciones fúngicas.

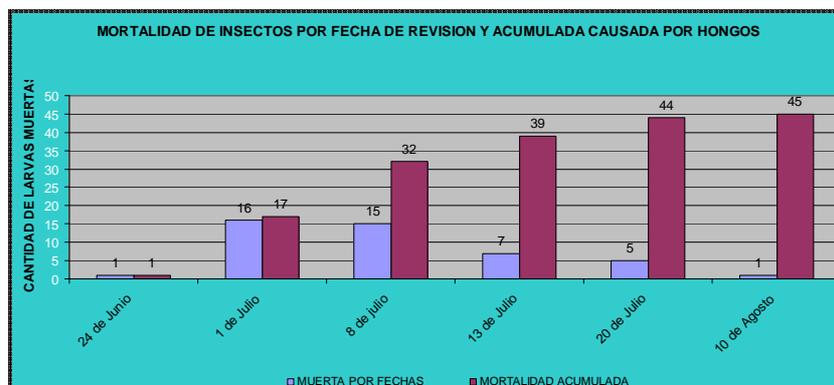


Figura 32. Mortalidad de larvas de Scarabaeidae por fecha de revisión y acumulada causada por hongos nativos en una parcela de maíz en la localidad de Tonacatepeque (Jun-Sep 2005).

#### 4.1.3 Incidencia de micosis en el desarrollo de los insectos.

Cabe mencionar, que de 45 insectos muertos (correspondientes al 36.53% de la población total de insectos recolectados) hubo incidencia de micosis tanto de estadio larval, como de pupas y adultos.

La figura 33, muestra la distribución de las incidencias de infección fúngica por estadio de desarrollo. Como se observa la mayor mortalidad por infección fúngica se dio en larvas, alcanzando un 30% (36 larvas), mientras que, las mortalidades para los estadios de desarrollo pupa y adulto, son de 13% y 2%, respectivamente. Se puede observar que esta familia de insectos, es menos susceptible a enfermedades fúngicas a medida que avanza su desarrollo.

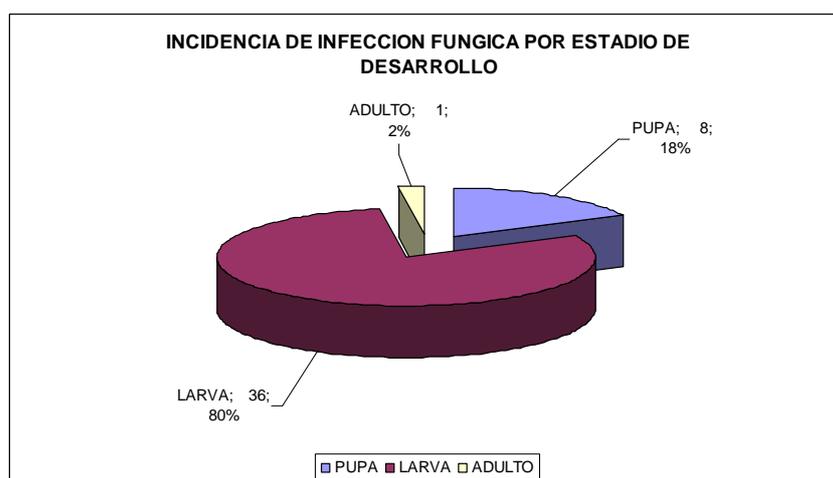


Figura 33. Incidencia de infección fúngica natural por estadio de desarrollo en insectos Scarabaeidae recolectados en la localidad de Tonacatepeque en un cultivo de maíz. (Jun 2005).

Esto podría explicarse por el hecho de que en terrenos donde se practican algunas prácticas de conservación de suelo y donde no se quema, como es el caso de esta localidad, hay proliferación de microorganismos benéficos, como hongos nativos que se encontraron controlando en gran medida las larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).

#### 4.1.4 Identificación de los adultos obtenidos.

Se reconocieron los géneros de Scarabaeidae correspondientes a un total de 62 adultos obtenidos de la población de larvas de Tonacatepeque, que corresponde al 50% de la población total recolectada en dicha localidad. Los insectos identificados pertenecían a los géneros: *Tomarus sp 1* (33.37%), *Tomarus sp 2* (17.74%), *Euphoria sp 1* (32.25%), *Euphoria sp 2* (4.33%) y *Anomala sp* (11.29%). La distribución por género se detalla a continuación en la figura 34.

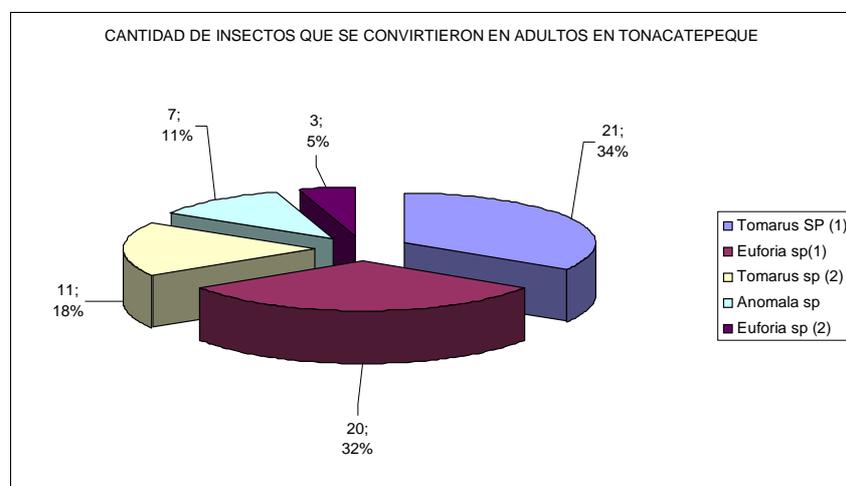


Figura 34. Cantidad de insectos adultos obtenidos clasificados a nivel de género en la localidad de Tonacatepeque. (Jun-sep 2005).

En la figura 35, se puede observar los adultos de los géneros identificados en esta zona.

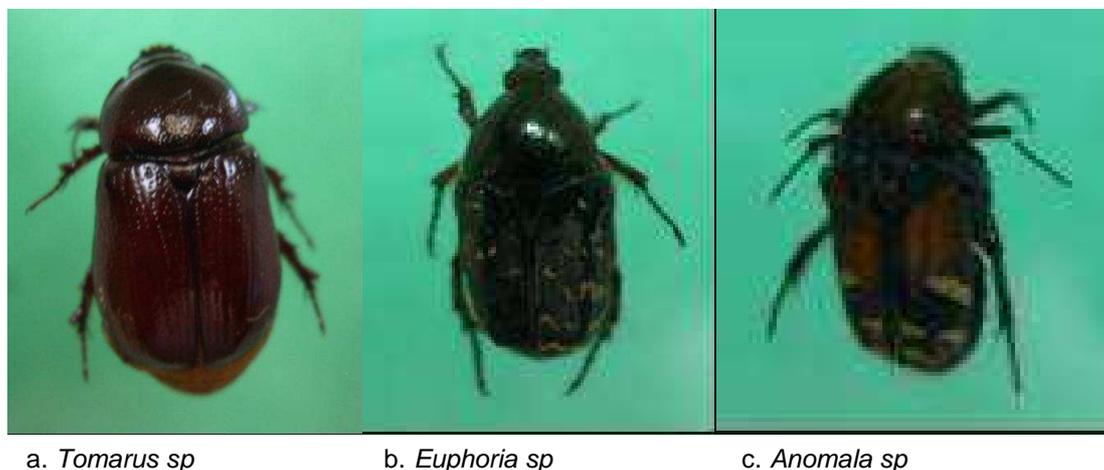


Figura 35. Adultos obtenidos de la localidad de Tonacatepeque (Junio de 2005).

Se pudo observar que en dicha localidad existen cinco especies diferentes incluidas en tres géneros y, de igual forma, se presenta un control biológico, basado especialmente en hongos patógenos, mientras que, como se verá en la sección 4.2, en la región de Ahuachapán, específicamente en el Caserío Los Horcones del Cantón El Tigre, solamente pudieron ser determinadas tres especies pertenecientes a un mismo género: *Phyllophaga sp* y, en ella, a diferencia de la primera localidad mencionada, no pudo ser determinado ningún efecto de control biológico basado en hongos.

La figura 36 muestra el resumen de los resultados finales obtenidos con las larvas recolectadas en Tonacatepeque. Del total de larvas colectadas, un 50% (62 insectos) se convirtió en adultos, cerca de 37%(45 insectos) murieron por infección fúngica y un 11% (13 larvas) murieron por otras causas, como manipulación o estrés entre otros y, finalmente, un 2%(3 larvas) se encontraban aún vivas y sanas hacia el 3 de septiembre de 2005 cuando fue realizada la última revisión.

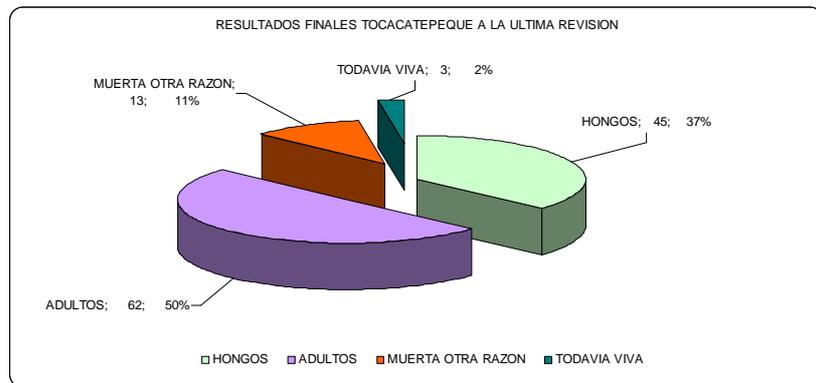


Figura 36. Resultados finales en la revisión del lote de larvas de scarabaeidae recolectadas en una parcela de maíz en la localidad de Tonacatepeque. (Jun-sep 2005)

#### 4.1.5 Aislamiento de hongos de larvas con signos.

De aproximadamente un 37% de insectos parasitados (45 animales), entre larvas y pupas, se aislaron únicamente 29 de ellos, de los cuales solamente dos se incluyeron en la prueba de patogenicidad, identificados como: L<sub>1</sub>G<sub>44</sub> y L<sub>1</sub>G<sub>105</sub>.

Como resultado de este proceso de aislamiento se conserva bajo refrigeración, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA, los aislamientos codificados como L<sub>1</sub>M<sub>131</sub>, L<sub>1</sub>G<sub>52</sub>, L<sub>1</sub>M<sub>123</sub>, L<sub>1</sub>G<sub>71</sub>, L<sub>1</sub>G<sub>93</sub>, L<sub>1</sub>G<sub>33</sub>, L<sub>1</sub>G<sub>44</sub> y L<sub>1</sub>G<sub>34</sub>. Sin embargo, solamente se identificaron los aislamientos L<sub>1</sub>G<sub>44</sub> y L<sub>1</sub>G<sub>105</sub>, puesto que, solamente ellos dos fueron incluidos como tratamientos en los bioensayos de patogenicidad y, al resto no le fue considerada, por lo tanto, necesaria la identificación taxonómica.

## **4.2 IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DE INSECTOS RECOLECTADAS EN EL MUNICIPIO DE AHUACHAPAN.**

De acuerdo al investigador<sup>1</sup> que realizó la determinación de las especies utilizadas, todas las larvas pertenecían al género *Phyllophaga* sp. Para el caso del ensayo realizado para la reactivación “in vivo” de los aislamientos fúngicos, solamente se determinó la presencia de *P. obsoleta*, mientras que, las larvas utilizadas en la primera y segunda prueba de patogenicidad, que fueron recolectadas en el mismo lugar pero, en fechas distintas, se identificaron tres especies, *P. obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi*. En el caso particular del área muestreada para obtener las larvas utilizadas en esas dos pruebas, en el Caserío Los Horcones del Cantón El Tigre en Ahuachapán, la densidad poblacional de la plaga fue alta, puesto que, se verificaron densidades de 3.33 y 2.17 larvas por metro cuadrado, en dos momentos cronológica y climáticamente distintos, junio y diciembre, respectivamente. King (1994), menciona que el factor crítico de larvas es de 4 por metro cuadrado y, se puede ver que en la recolección realizada en época lluviosa (junio de 2005), está bastante cerca del umbral crítico. Por otro lado, la densidad de la plaga expresada en términos de larvas por postura fue en promedio de 6.06 larvas por postura de maíz.

## **4.3 REACTIVACION “IN VIVO” DE LOS AISLAMIENTOS FUNGICOS.**

En la parte de reactivación “in vivo” de los aislados fúngicos, los resultados en cuanto a mortalidad obtenidos para los 5 tratamientos fúngicos fueron extremadamente bajos, puesto que, solamente murieron dos larvas de un total de 54, luego de 6 revisiones y 23 días después de inoculación (DDI). Dichas larvas murieron luego de 10 días después de la inoculación y correspondían a los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, pertenecientes a los géneros de hongos *Aspergillus* sp y *Gliocladium* sp. Sin embargo, no se determinó que la muerte de las larvas fuera causada por micosis, puesto que, no fue observable para ninguno de los dos casos la presencia-aparición de micelio luego de un período de aislamiento en cámaras húmedas y, por el contrario, las mismas daban la apariencia de haber sufrido

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. Msc. Mario Ernesto Parada Jaco, 15 de enero de 2006, Centro Nacional Agropecuario y Forestal (CENTA). Dirección de correo electrónico:

algún trastorno durante el proceso de manipulación a que fueron sometidas durante la inoculación de las suspensiones de aislados y su posterior manejo.

#### 4.4 PRIMERA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.

La mortalidad alcanzada por los distintos tratamientos a los 21 DDI es bastante baja, puesto que, las mortalidades alcanzadas no superan el 15%<sup>1</sup> de los insectos inoculados por tratamiento en el ensayo; tal como lo muestra la figura 37.

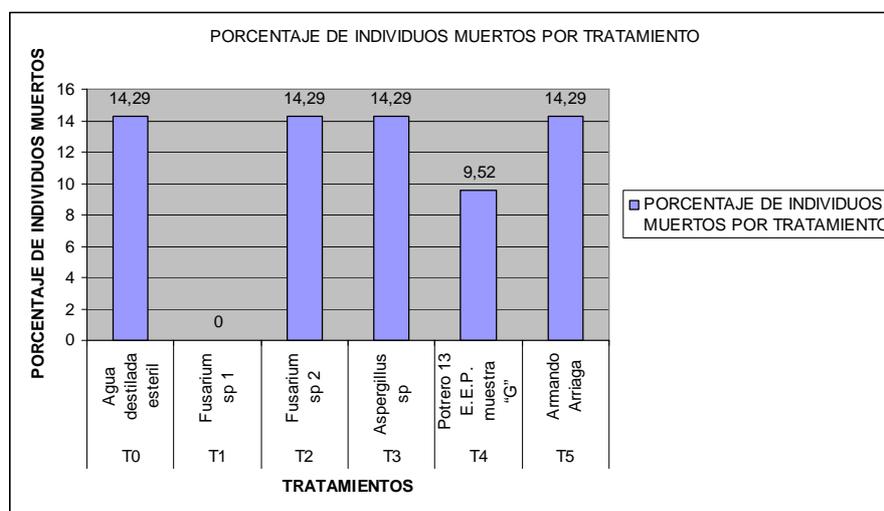


Figura 37. Porcentaje de larvas de Scarabaeidae muertas por cada tratamiento 21 DDI en la primera prueba de patogenicidad.

Sin embargo, es de aclarar que la causa de la muerte de dichas larvas no fue causada o no pudo ser determinada por micosis causada por los tratamientos, puesto que, no hubo desarrollo de micelio luego de que las mismas fueron colocadas en cámaras húmedas adecuadas. Por el contrario, las muertes reportadas fueron causadas por bacterias que, de acuerdo a un investigador consultado<sup>2</sup>, podrían haber sido inducidas a proliferar y causar infecciones y posteriormente la muerte de las larvas debido a la saturación de humedad a la que los recipientes de confinamiento fueron sometidos.

<sup>1</sup> Lo que representaría tres insectos muertos de un total de 21 que fueron inoculados por tratamiento.

<sup>2</sup> Ing Agr. Msc. Mario Ernesto Parada Jaco, 20 de Diciembre de 2005. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Comunicación personal.

Dichas mortalidades se ven bastante incrementadas de acuerdo a la información presentada en la figura 38, la cual muestra los porcentajes de mortalidad causadas por cada tratamiento a los 23 DDI, muertes que, nuevamente fueron causadas por bacterias mas no por los hongos tratamiento aplicados.

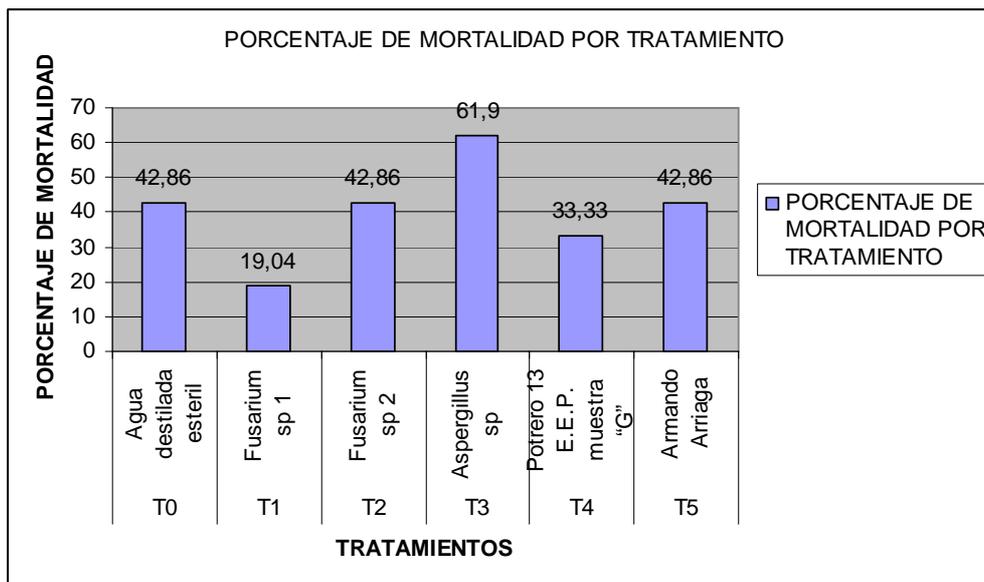


Figura 38. Porcentaje de mortalidad de larvas de Scarabaeidae por tratamiento después de 23 DDI en la primera prueba de patogenicidad.

Este incremento de mortalidad se muestra en la figura 39, en la que se observa claramente que, dentro del periodo crítico de revisión de la infección fúngica de 21 DDI recomendada por el investigador consultado<sup>1</sup>, han muerto solamente 14 larvas para la totalidad de los 6 tratamientos y, como fue mencionado la mortalidad se incrementa hacia los 23 DDI, sin embargo, en ninguno de los casos de muertes de larvas presentados antes ni a los 23 DDI fue determinada la presencia de infección fúngica.

<sup>1</sup> Ing. Agr. Msc. Mario Ernesto Parada Jaco, 20 de Diciembre de 2005, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Comunicación personal.

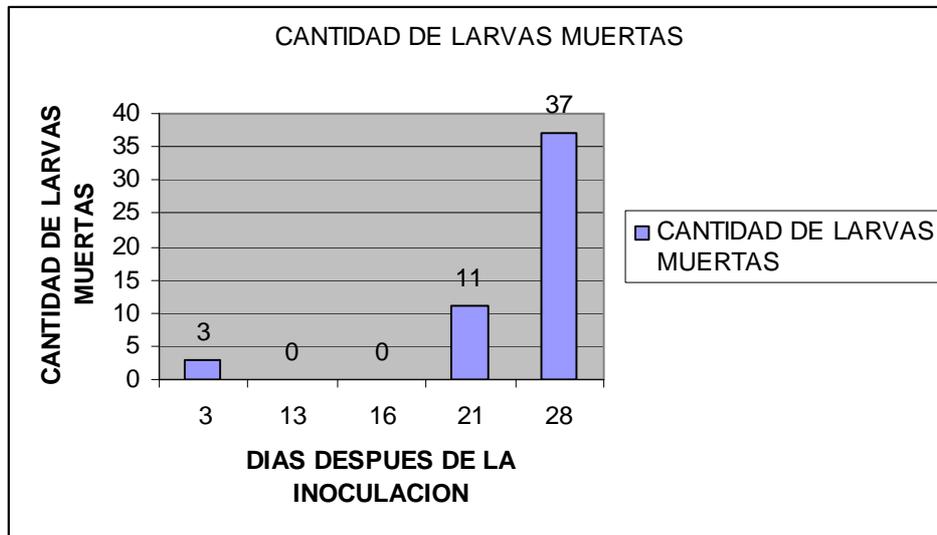


Figura 39. Numero de larvas de Scarabaeidae muertas desde los 3 hasta los 23 DDI en la primera prueba de patogenicidad.

En lo referente a la parte estadística, se realizó la prueba de análisis de varianza para tratar de establecer si había alguna diferencia significativa a nivel estadístico en los resultados obtenidos. El análisis de varianza demostró que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos aplicados, por lo cual se pensaría en utilizar cualquiera de los aislados fúngicos para controlar las especies *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi* que fueron utilizadas en la investigación. Sin embargo, esta afirmación no es del todo válida pues, como se mencionó, en ninguno de los casos de muertes de larvas reportados fue posible la determinación de presencia de infección fúngica. De esta manera, el análisis que amerita dicho resultado es que los factores que influyeron en la mortalidad de las larvas, ya sea, problemas bacteriales y manejo del ensayo tuvieron igual influencia en las unidades experimentales. El análisis de varianza se muestra en el anexo 9.

#### 4.5 SEGUNDA PRUEBA DE PATOGENICIDAD.

La mortalidad registrada por los dos tratamientos fúngicos a base de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces sp* y el testigo a base de agua destilada estéril luego de 21 DDI fue de 0%.

Todo esto indicaría que dichos aislados fúngicos no fueron efectivos contra las larvas de *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi* bajo las condiciones en las que fueron evaluados.

Algunas de las consideraciones que podrían explicar este hecho son las siguientes:

1. Carreño (2003), menciona que existe una tendencia bastante extendida de generalizar el control de varias especies de un complejo plaga, tal cual es “gallina ciega”, con un aislamiento de hongo entomopatógeno, lo cual no es necesariamente la regla. Por lo tanto, es necesaria la realización de pruebas específicas para lograr la determinación de los aislados o cepas que podrían ser efectivas contra una o varias especies dentro de un complejo plaga.
2. Esa generalización de control mencionada no es válida por el hecho de la especificidad con la cual algunos aislados fúngicos actúan, así López et al (1997), menciona que los hongos *Beauveria sp* y *Metarhizium sp* aislados de “gusano blanco de la papa”; en pruebas de patogenicidad sobre dicho insecto garantizaron los mayores porcentajes de mortalidad en los tratamientos que aquellos aislamientos de hongos de iguales géneros que procedían de otras especies de insectos, debido a que estas cepas han sufrido procesos de selección natural y coevolución con el insecto, factores que pueden generar en ellas una mayor especificidad en la infección de un insecto plaga en particular. Shannon (1994) menciona igualmente que la mayoría de aislamientos de otros insectos y aislamientos extranjeros aún aquellos con buena infectividad en otras especies de Scarabaeidae tuvieron baja o ninguna infectividad en *Phyllophaga menetriesi*, *P. vicina* y *P. obsoleta*. Esto podría explicar por qué los aislados fúngicos obtenidos de los géneros *Anomala sp*, *Cyclocephala sp*, *Euphoria sp*,

*Phileurus sp* y *Tomarus sp* que fueron utilizados en este caso sobre larvas de *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi*, no presentaron actividad patogénica sobre las mismas.

3. Incluso para especies de hongos entomopatógenos con reconocida acción no especializada sobre una especie o especies de plaga, como lo es *Beauveria bassiana* puede llegar a desarrollarse su actividad sobre algunas especies en particular sobretodo ante condiciones ambientales favorables. (Ríos, 2001). Esta idea es confirmada por Ferrón et al (1972) y por Fargues (1976), citados por Carreño (2003), quienes afirman que, a pesar de conocerse que *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* pueden llegar a infectar cerca de 100 insectos en varios ordenes distintos, en algunos aislamientos de los mismos se ha llegado a determinar la existencia de especificidad.
4. Revisando las condiciones en las que se realizó el estudio resalta como importante el hecho de haberse evaluado los hongos como aislados multiespóricos, el comportamiento patogénico de los mismos podría variar de un ensayo a otro incluso dentro de la misma especie<sup>1</sup>. Algo que no sucedería al trabajarse con cepas monospóricas, cuyas características genéticas y, por tanto, de virulencia se mantendrían constantes en diferentes pruebas de patogenicidad.
5. Uno de los aspectos que influyen en la mortalidad de insectos plaga a través del uso de entomopatógenos es el estadio en que aquél se encuentra cuando el control con dicho producto es realizado. En este sentido, Carreño (2003) en el caso del control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* menciona que existe una clara relación entre el estadio de desarrollo del insecto plaga y la acción controladora de los hongos entomopatógenos, pues con un aislamiento

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. Blanca Daysi Ávila de Solano, 14 de enero de 2005, Catedrática de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Comunicación personal.

de *Verticillium lecanii* fue el estadio de huevo el que presentó los mayores porcentaje de mortalidad.

6. Para el caso de “Gallina Ciega”, existe una relación bastante clara entre la capacidad controladora de los aislamientos fúngicos y el instar larval en que el insecto se halla, pues, como regla general se afirma que en los estadios tempranos de desarrollo se encuentra el mejor momento de control a través del uso de entomopatógenos<sup>1</sup>. Esta idea es confirmada por Hidalgo (2001), pues con pruebas realizadas con el hongo *Beauveria bassiana* sobre larvas de segundo instar de *Phyllophaga menetriesi* fue bastante buena, puesto que, se presentaron altos índices de mortalidad, sin embargo, estos mismos resultados no fueron obtenidos en larvas de tercer instar de la misma especie ni contra otras especies del mismo género.
  
7. Se determinó que en la localidad del cantón El Transito I, caserío Los Quijanos en Tonacatepeque, Departamento de San Salvador existen cinco especies diferentes incluidas en tres géneros y, de igual forma, se presenta una buena actividad de biocontroladores fúngicos, mientras que, en el Caserío Los Horcones del Cantón El Tigre en el Municipio de Ahuachapán, solamente pudo ser determinada la presencia de tres especies de “gallina ciega” pertenecientes a un mismo género, *Phyllophaga sp* y, para la misma, la actividad de controladores de tales especies no pudieron ser constatados en la investigación.

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. Mario Ernesto Parada Jaco, 20 de Diciembre de 2005, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Comunicación personal.

## 5. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los 8 aislamientos utilizados generó patogenicidad sobre las larvas de *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi*, bajo las condiciones en las que fueron evaluados en la investigación.
2. Los aislamientos estudiados no provocaron mortalidad en las larvas de *Phyllophaga obsoleta*, *P. elenans* y *P. menetriesi*, posiblemente porque no se alcanzaron suspensiones con concentración de conidias por mililitro de  $10^8$  ó mayores.
3. La mortalidad de larvas de “Gallina Ciega” pudo no haberse dado por la variabilidad genética que los aislados multiespóricos utilizados tenían.
4. Existe probabilidad de especificidad de los aislados fúngicos en su rango de hospederos.
5. El estadio larval de las “gallinas ciegas” (Coleóptera: Scarabaeidae) utilizado no fue susceptible al control biológico con los hongos utilizados.
6. En larvas colectadas en Tonacatepeque se presentaron, en forma natural, enfermedades fúngicas que provocaron síntomas como falta de apetito y de movilidad, muerte y momificación; crecimiento de micelio y esporulación del hongo sobre el insecto parasitado, representando una incidencia del 37% aproximadamente.
7. En terrenos donde se practican algunas prácticas de conservación de suelo y donde no se quema el mismo hay proliferación de microorganismos benéficos, como hongos nativos que se encontraron controlando en gran medida las larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae).

8. Se pudo observar que en dicha localidad existen cinco especies diferentes incluidas en tres géneros y, de igual forma, se presenta un control biológico, basado especialmente en hongos patógenos, mientras que, en la región de Ahuachapán, solamente pudieron ser determinadas tres especies pertenecientes a un mismo género: *Phyllophaga* sp y, en ella, no pudo ser determinado ningún efecto de control biológico basado en hongos como en la primera.
  
9. Seguir con investigaciones similares, para encontrar cepas o aislamientos capaces de controlar esta plaga bajo un enfoque ecológico.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Realizar pruebas de patogenicidad con aislamientos fúngicos que sean obtenidos y evaluados de la misma especie o al menos género de Scarabaeidae.
2. Llevar a cabo pruebas de patogenicidad sobre larvas de Scarabaeidae de una zona específica con aislados fúngicos obtenidos de esa misma área geográfica.
3. Utilizar otras metodologías de inoculación de larvas como la aspersión de las suspensiones sobre la plaga de interés.
4. Realizar pruebas de patogenicidad sobre larva de Scarabaeidae que se hallen en estadíos larvales más jóvenes (larva 1 o 2).
5. Utilizar aislamientos monospóricos en las pruebas de patogenicidad.
6. No generalizar el control de Scarabaeidae como tal, sino enfocarse en estudios a nivel de especies o género como mínimo.
7. Realizar pruebas de patogenicidad con aislados obtenidos directamente de insectos parasitados, o reactivar dichos aislamientos antes de utilizarlos.
8. Debe asegurarse que los aislamientos a utilizar en bioensayos sean viables antes de ser utilizados.
9. Al productor de El Cantón El Transito I de Tonacatepeque se le recomienda no llevar suelo de otras zonas agrícolas a su parcela, pues no pudo ser determinada la presencia de *Phyllophaga* sp en ninguna de las muestras obtenidas.

10. Al productor del cantón el tigre de Ahuachapán se le recomienda la eliminación de plantas atractivas para la plaga del área de su parcela, así como también la incorporación de rastrojos.
  
11. Seguir con investigaciones similares, para encontrar cepas o aislamientos capaces de controlar esta plaga bajo un enfoque ecológico.

## 07. BIBLIOGRAFIA.

1. Agencia Universitaria de Periodismo Científico. s.f. Al Gusano cacho le llego la hora. (en línea). s.l. Consultada 20 Dic. 2005. disponible en: <http://mafalda.univalle.edu.co/~aupec/AUPEC/noviembre96/gusano.html>.
2. Aguilar B., L; Molina, JdD; Santos, BM. 2004. Manejo Integrado de Plagas: Cultivo de la papa, Guía MIP. (Disco compacto). Managua, Nicaragua. Impresión Comercial La Prensa. 1 disco compacto.
3. Arango Lopera, JD; Giraldo Ocampo, RA; Londoño Zutuaga, ME; Ríos López, AM. 2001. Desarrollo de metodologías para la producción de enemigos naturales de la chiza y su evaluación y transferencia en fincas de agricultores del oriente antioqueño. (en línea). Colombia. Disponible en: <http://200.13.202.26:90/pronatta/proyectos/pdf/971053059res.pdf>.
4. Archer, TL; Cronholm, G; Morrison, P; Parker, RD; Patrick, CD; Porter, P; Troxclair, N. 2001. Managing insect and mite pests of Texas corn. (En línea). EEUU. Consultado 13 mar. 2005. Disponible en: <http://www.insects.tamu.edu/extension/bulletins/b-1366.html>.
5. Argüello, H; Cáceres, O; Morón, MA. 1999. Guía ilustrada para la identificación de especies de gallina ciega (*Phyllophaga* sp) presentes en las principales zonas agrícolas de Nicaragua. Nicaragua. 13 P.
6. Ayala Morán, JE; Monterroso, LE. 1997. Manejo de La Gallina Ciega. Ed. A Silva; M Hernández. INC. Corporación Gráfica. 35 p.
7. Ávila, BD; Iraheta Villatoro, R; Serrano Cervantes, L. 2004. Segundo informe de avance de resultados del proyecto: "Búsqueda, aislamiento, reproducción y evaluación de hongos entomopatógenos de la plaga de "Gallina Ciega", en la zona Central de El Salvador. "Abril 2003-Abril 2004). El Salvador. 20 p.

8. Barrios, M; Bustamante, Z; Gómez, M; Guharay, F; Jiménez, C; Lacayo, L; Quiroz, I. 1996. Control Biológico de Plagas Con Hongos entomopatógenos. In Taller Latinoamericano sobre bioplaguicidas (I, 1996, Nicaragua). Memoria. Eds. A. Sabillón; M. Bustamante. Managua, Nicaragua. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. p 51.
9. Bentley, M. 2001. Diccionario Campesino Hondureño. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. v. 42, 111 p.
10. Bustamante, Z; Gómez, M; Guharay, F; Jiménez, C; Quiroz, I. 1996. Disponibilidad de hongos entomopatógenos para manejo de Plagas insectiles en Nicaragua. In Taller Latinoamericano sobre bioplaguicidas (I, 1996, Nicaragua). Memoria. Eds A. Sabillón; M. Bustamante. Managua, Nicaragua. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. p 52.
11. Bustillo Pardey, AE; González García, MT; Valencia Jiménez, A. 2001. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) no. 60: 31-35.
12. Cano E.; Carballo M.; Chapul, P; Fernández O; Gonzáles L; Gruber A; Kathrina G; Falguni H; Narváez C; López, P; Rizo, C; Rodríguez, A; Rodríguez, C; Salazar D. 2004a. Control Biológico de Plagas Agrícolas. (Disco compacto). Managua, Nicaragua. INPASA. 1 disco compacto. (Serie técnica. Manual técnico/CATIE; N° 53).
13. Cano, E; Castillo, P; Gutiérrez, C; Jiménez, E; Laguna, T; Molina, JdD; Monterrey, M; Padilla, D; Rojas, A; Sarria, M. 2004b. Manejo Integrado de Plagas: Cultivo del Tomate, Guía MIP. (Disco compacto). Managua, Nicaragua. Impresión Comercial La Prensa. 1 disco compacto.

14. Carballo, M. 1993. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) no. 43: i-iv.
15. Caro C, LF; Cotes, AM; Espinel C, C; Villamizar R, LF. Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). (en línea). Revista Colombiana de Entomología 31 (1): 79-33 (2005). Consultada 10 dic 2005. Disponible en: [www.agora.org.do/efecto/spodoptera.pdf](http://www.agora.org.do/efecto/spodoptera.pdf)
16. Carreño, IA. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis Msc. (en línea). Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana. Consultado 23 jun. 2005. Formato PDF. Disponible en [http://www.ciat.cgiar.org/hpm/pdf/tesis\\_irina.mitic.gob.ni/Docushare/dscgials.p](http://www.ciat.cgiar.org/hpm/pdf/tesis_irina.mitic.gob.ni/Docushare/dscgials.p)
17. CASSA. 2001. Boletín Técnico. Manejo Integrado de la Gallina Ciega (*Phyllophaga spp*). Boletín Técnico (El Salvador) no. 3: 14-13.
18. Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA). s.f. Informe técnico final proyecto "Evaluación de una cepa nativa de *Fusarium sp*. Para el manejo de la broca del café". (en línea). Colombia. Consultado 3 Nov. 2005. Disponible en: <http://200.13.202.26:90/pronatta/proyectos/pdf/971251070inf.pdf>
19. Coto, D .2000. Gallina ciega como planta de cultivos anuales y perennes. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) no. 55: i-iv.

20. Cranshaw, WS; Zimmerman, R. 2004. Billbugs and White Grubs. (En línea). Estados Unidos de Norte América. Extensión cooperativa de la Universidad del Estado de Colorado. Consultado el 26 de febrero de 2004. Disponible en: [www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05516.html](http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05516.html).
21. De Faria, M; Mccoy, C; Quintela, ED. s.f. Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. (en línea). EEUU. Consultado 16 jun. 2005. Disponible en: <http://www.agctr.lsu.edu/s265/mccoy.htm>.
22. Echegoyén, PE; Escobar Betancourt, JC; Menjivar, RA; Rivas, AW; Sermeño, JM. 2004. Manual técnico: Manejo integrado de plagas. (Disco compacto). San Salvador, El Salvador. Ed. Unidad de Postgrado, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. 1 disco compacto.
23. El Cogollero del Maíz. s.f. (en línea). s.l. Consultada 10 Dic. 2005. Disponible en: <http://www.insectariumvirtual.com/termitero/nicaragua/DOCUMENTOS%20DE%20INTERES/PLAG-2.html>
24. FAO (Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la alimentación). s.f. Buenas Prácticas Tecnológicas. (en línea). Honduras. Consultado 11 jul. 2005. Disponible en: [http:// \(http://www.fao-sict.un.nn/ensayos/index.htm](http://www.fao-sict.un.nn/ensayos/index.htm).
25. Fragas, I; Gema G. Fleitas, G; Hidalgo, L. s.f. Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico. (en línea). La Habana, Cuba. Consultado 25 de may. 2005. disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos17/formulacion-de-hongos/formulacion-de-hongos.shtml/>

26. France I, A; Gerding G, M; Sandoval V, A; Espinoza T, S; Vivanco B, E. 1999. Patología de insectos. In "Producción orgánica un desafío para el 2000" (1999, Chile). (en línea). Chile. Consultado 2 mar. 2005. Disponible en: <http://www.agendaorganica.cl/atecnicos.htm>.
27. France, A; Gerding, M; Rodríguez, M. 2004. Evaluación de dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) para el control de larvas de gusano blanco *Hyalumorpha elegans* Burm. (Coleóptera: Scarabaeidae). Agricultura técnica no. 64(1):17-24. Chile.
28. FUNICA. s.f. Producción y uso de hongos entomopatógenos. (en línea). Nicaragua. Consultado 13 de Sep. 2005. Disponible en: <http://www.sia.net.ni/DescargarContenido.do?documento=179>
29. García, A; García Marí, E. s.f. *Aonidiella aurantii* (Homóptera: Diaspididae): Enemigos Naturales y Control Biológico. (en línea). s.l. Consultado 15 mar. 2005. Disponible <http://www.seea.es/conlupa/Aonidiella/Aonidiella3.htm>
30. Hernández, M de; Kuno, G; Mullet, J. 1932. Patología de insectos con énfasis en enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. 2ed. Cali, Colombia. Universidad del Valle. 212p.
31. Hidalgo, E. 2001. Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* sp. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) no. 60: i-iv.
32. King, ABS. 1994. Biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga spp* en América Central. In Seminario Taller Centroamericano sobre biología y control de *Phyllophaga spp*. (I, 1994, Costa Rica). Memorias. Eds. M. Carballo; P. Shannon. Turrialba, Costa Rica. CATIE. P 74.

33. Laguna, T; Nicaragua Altamirano, K; Pavón, JF. 2004. Manejo Integrado de Plagas: Cultivo de la Chiltoma: Guía MIP. (disco compacto). Managua, Nicaragua, Impresión Comercial La Prensa. 1 disco compacto.
34. Lecuona, RE. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Ed. RE Lecuona. Buenos Aires, Argentina. Talleres Gráficos Mariano más. 333 p.
35. López Ávila, A; Torres López, R. 1997. Estudios básicos para el control microbiológico del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria spp* y *Metarhizium sp.* (en línea). Revista colombiana de Entomología no. 23 (2): 1-14. Consultada 12 enero de 2006. Disponible en: [www.agora.org/pdf/memoria%estbas.pdf](http://www.agora.org/pdf/memoria%estbas.pdf)
36. Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. (en línea). Manejo Integrado de Plagas no. 63. Consultado 16 may. 2005. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/information/RMIP/rev63/pag95-103.pdf>.
37. Orantes Guillén, CI; Sandoval Zetino, EA. 1997. Identificación del complejo Gallina ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) en los departamentos de Cuscatlán, Ahuachapán y San Vicente. Tesis Ingeniero Agrónomo. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 66p.
35. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Medio de cultivo para la preservación de virulencia en cepas de hongos entomopatógenos. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. [en línea]. La Habana Cuba. Certificado de Autor de Invención. Disponible en: <http://www.ocpi.cu/doc/1939/t11136.PDF>.

38. Parada Jaco, ME. 1999. Potencialidad de los hongos entomopatógenos para el manejo de gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleóptera: Melolonthidae) en el cultivo del maíz. Tesis Msc. Estado de México, México, Colegio de post graduados. Instituto de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 73 p.
39. Plagas importantes en el cultivo de piña. s.f. (en línea). s.l. Consultado 13 de abr. 2005. Disponible en: <http://www.w3.org/TR/REC-html40>.
40. Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS –DANIDA). 2004a. Cultivando maíz con menos riesgo. (Disco compacto). 2ed. Managua, Nicaragua. Impresión Comercial La Prensa. 1 disco compacto.
41. Proyecto PLAG-SALUD (OPS/OMS – DANIDA). 2004b. Cultivando frijol con menos riesgo. (Disco compacto). 2ed. Managua, Nicaragua. Impresión Comercial La Prensa. 1 disco compacto.
42. Rendón Valdés, M. 2001. Control biológico de chinche subterráneo de la yuca *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera; Cydnidae) con hongos entomopatógenos Hyphomycetes. Tesis Msc. (en línea). Medellín, Colombia. Facultad de Agronomía, Universidad de Santa Rosa de Cabal. Consultado 17 dic. 2006. Formato PDF. Disponible en [http://www.prgaprogram/webciat/ipm/pdfs/tesis\\_chinche.pdf](http://www.prgaprogram/webciat/ipm/pdfs/tesis_chinche.pdf)
43. Ríos Cardona, JC. 2001. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En formulación comercial y artesanal para el manejo del picudo negro *Cosmopolitas sordidus* Germar en plátano. Tesis Ingeniero Agrónomo. (en línea). Colombia. Universidad de Caldas. Consultado 15 ene. 2006. Formato PDF. Disponible en: [http://www.caldasuniv.cgiar.org./hpm/pdf/tesis\\_riocar.mitic.gob.ni/Docushare/ds\\_cgials.py](http://www.caldasuniv.cgiar.org./hpm/pdf/tesis_riocar.mitic.gob.ni/Docushare/ds_cgials.py)

44. Rizo, R. 2000. Influencia de enmiendas orgánicas en la efectividad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el manejo de *Phyllophaga* sp en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*). In Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Mosca Blanca y Geminivirus (9), Congreso Latinoamericano y del Caribe de Manejo Integrado de Plagas (3, 2000, Panamá, República de Panamá). Memoria. Panamá. p. 33.
45. Shannon, P.J. 1994. Control microbiano de *Phyllophaga spp* (Coleóptera; Melolonthidae). In Seminario Taller Centroamericano sobre biología y control de *Phyllophaga spp* (I, 1994, Costa Rica). Memorias. Eds. M. Carballo; P. Shannon. Turrialba, Costa Rica. CATIE. P 30-31.
46. Trabanino, R. 1993. Guía para el manejo integrado de plagas invertebradas en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. Zamorano Academic Press. 156 p.
47. Wigglesworth, V.B. 1974. Insect physiology. 7ed. Chapman and Hall. Londres. P. 97.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. Mapa de ubicación de zonas de importancia: trabajo de campo y laboratorio.



Anexo 2. Formulario de registro de información asociada al material biológico.

**Trabajo de Graduación: “Patogenicidad de Hongos Nativos en el Control de Gallina Ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) Bajo Condiciones de Laboratorio”.**

Formulario de información del agroecosistema relacionado a las muestras de larvas de Gallina Ciega (Coleóptera; Scarabaeidae) recolectadas en la zona muestreada.

Colector\_\_\_\_\_

Fecha\_\_\_\_\_

Propietario del terreno\_\_\_\_\_

Cultivo actual\_\_\_\_\_

Cultivo anterior\_\_\_\_\_

Ubicación del lugar:

➤ Departamento\_\_\_\_\_

➤ Municipio\_\_\_\_\_

➤ Cantón\_\_\_\_\_

➤ Caserío\_\_\_\_\_

Cobertura orgánica viva del suelo\_\_\_\_\_

Cobertura orgánica muerta del suelo\_\_\_\_\_

Humedad del suelo\_\_\_\_\_

¿Se han hecho prácticas de quema del suelo en los últimos tres años?\_\_\_\_\_

Profundidad de excavación\_\_\_\_\_

Número de excavaciones realizadas\_\_\_\_\_

¿Cómo ha sido la presencia de la plaga en el terreno?

➤ Escasa\_\_\_\_\_

➤ Poca\_\_\_\_\_

➤ Regular\_\_\_\_\_

➤ Abundante\_\_\_\_\_

¿Todos los años?\_\_\_\_\_

¿Todos los meses?\_\_\_\_\_ ¿En cuáles?\_\_\_\_\_

¿Desde cuando es una plaga fuerte en la zona?\_\_\_\_\_

Cantidad de larvas recolectadas en el lugar\_\_\_\_\_

Pequeñas\_\_\_\_\_

Medianas\_\_\_\_\_

Grandes\_\_\_\_\_

Anexo 3. Hoja de toma de datos de los tratamientos en estudio.

Responsable: \_\_\_\_\_

Supervisó: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

|  |  |
|--|--|
| <b>Identificación de la larva</b>                                    |  |
| <b>Fecha de inoculación de tratamiento</b>                           |  |
| <b>Fecha de aparecimiento de síntomas</b>                            |  |
| <b>Días entre inoculación y síntomas</b>                             |  |
| <b>Fecha probable de muerte</b>                                      |  |
| <b>Días entre inoculación y muerte</b>                               |  |
| <b>DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS CUALITATIVAS DE LAS LARVAS</b> |  |
| <b>síntomas</b>  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| <b>Comportamiento</b>  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| <b>Aspecto</b>   |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| <b>movilidad</b>   |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| <b>Signos</b>  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

#### Anexo 4. Preparación de medio de cultivo PDA.

- 1- Pesar 40 gramos del reactivo (PDA) y mezclarlo con un litro de agua destilada, agitando la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea.
- 2- Sellar el frasco con papel aluminio y tirro y poner a esterilizar la mezcla en autoclave por 15 minutos, a 121 °C y 15 psi (1 bar de presión). Después de este proceso se puede verter el medio en platos Petri o se puede guardar en el frasco, para su uso posterior. En este caso el frasco se debe poner en baño de maría al momento que se vaya a verter.
- 3- Verter aproximadamente de 10 a 20 cc del medio en cada plato Petri: esto se debe hacer cuando la temperatura del medio permita su manipulación, evitando que se enfríe completamente, o sea antes que se inicie la solidificación del agar.
- 4- Dejar solidificar el medio en los platos Petri.

Anexo 5. Preparación de la solución amortiguadora fosfato pH 7.

1. Pesar 0.9315 gr. de acetato de potasio en balanza analítica.
2. Colocar esta cantidad de reactivo y se disolver con un poco de agua destilada.
3. Aforar en frasco volumétrico a 100 ml.
4. Medir el pH en potenciómetro.
5. Ajustar el pH a 7 con ácido acético o Hidróxido de potasio, de acuerdo a la necesidad.

## Anexo 6. Preparación de medio de cultivo ADS.

1. Pesar 65 gramos del medio y mezclarlo con un litro de agua destilada, agitando la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea.
- 2- Sellar el frasco con papel aluminio y tirro y poner a esterilizar la mezcla en autoclave por 15 minutos, a 121 °C y 15 psi. Después de este proceso se puede verter el medio en platos Petri o se puede guardar en el frasco, para su uso posterior. En el último de los casos, el frasco se debe poner en baño de maría al momento que se vaya a verter.
- 3- Verter aproximadamente de 10 a 20 cc del medio en cada plato Petri: esto se debe hacer cuando la temperatura del medio permita su manipulación, evitando que se enfríe completamente, o sea antes que se inicie la solidificación del agar.
- 4- Dejar solidificar el medio en los platos de Petri.

Anexo 7. Distribución de los tratamientos en el laboratorio.

|      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|
| T0R1 | T3R2 | T5R4 | T3R7 | T4R7 | T0R6 | T4R6 |
| T3R4 | T3R3 | T1R3 | T2R4 | T4R5 | T6R5 | T2R4 |
| T4R3 | T0R2 | T4R2 | T1R7 | T6R4 | T1R5 | T6R6 |
| T1R2 | T3R1 | T5R1 | T0R3 | T4R1 | T6R3 | T2R5 |
| T4R4 | T5R2 | T5R5 | T2R1 | T6R2 | T0R7 | T2R6 |
| T0R5 | T2R7 | T5R6 | T0R4 | T6R1 | T3R5 | T1R6 |
| T2R3 | T5R3 | T1R4 | T5R7 | T1R1 | T2R2 | T3R6 |

Donde cada repetición (R), está conformada por tres larvas, de la siguiente manera:

**T4R5**

|         |         |         |
|---------|---------|---------|
| LARVA 1 | LARVA 2 | LARVA 3 |
|---------|---------|---------|

Anexo 8. Utilización de la regla de Dyar para la uniformización del estadio de desarrollo de las larvas de las pruebas de patogenicidad.

| TRAZOS DE ANCHO DE CABEZA | CANTIDAD DE LARVAS CON ESA MEDIDA |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 10                        | 1                                 |
| 11                        | 1                                 |
| 17                        | 1                                 |
| 13                        | 1                                 |
| 20                        | 1                                 |
| 21                        | 1                                 |
| 22                        | 5                                 |
| 23                        | 2                                 |
| 24                        | 3                                 |
| 25                        | 6                                 |
| 27                        | 1                                 |
| 23                        | 2                                 |
| 29                        | 1                                 |
| 30                        | 1                                 |
| 32                        | 5                                 |
| 33                        | 5                                 |
| 34                        | 9                                 |
| 35                        | 5                                 |
| 36                        | 7                                 |
| 37                        | 3                                 |
| 33                        | 3                                 |

La regla de Dyar establece que las dimensiones lineares de las partes duras del cuerpo de los insectos incrementa en cada muda en una proporción constante, que usualmente es de 1.4. Esto indicaría que el resultado, al realizar la división de las medidas, en este caso del ancho de cabeza de las larvas de Scarabaeidae, expresada en trazos o unidades métricas de un intervalo de insectos, debe ser de 1.4 (adimensional). Por lo tanto, las larvas cuyo ancho de cabeza está dentro del rango de 33 hasta los 27 trazos, inclusive ambos extremos, están dentro del mismo estadio de desarrollo (instar larval).

Así:  $33 \text{ trazos} / 27 \text{ trazos} = 1.407 = 1.40$

Anexo 9. Análisis de varianza realizado a los resultados obtenidos de la primera prueba de patogenicidad.

| F DE V                | GL | SC   | CM   | FCAL      | FTAB | CONFIANZA |
|-----------------------|----|------|------|-----------|------|-----------|
| TRATAMIENTOS          | 4  | 0.32 | 0.03 | 2.00 N.S. | 2.69 | 5%        |
| ERROR<br>EXPERIMENTAL | 30 | 1.29 | 0.04 |           | 4.02 | 1%        |
| TOTAL                 | 34 | 1.61 |      |           |      |           |