

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



Evaluación de hongos entomopatógenos como biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Homóptera: Psyllidae: Triozinae) en papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio.

POR:

**GILMAR MAURICIO MEJIA CALDERON
ALEJANDRA GUADALUPE MENJIVAR SILIS
EDGARD GIOVANNI NUÑEZ MARTINEZ**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

SAN SALVADOR JULIO DE 2008

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR
ING. AGR Y LIC. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL
LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÓNOMICAS

DECANO
DR. E ING. AGR. REINALDO ADALBERTO LOPEZ LANDAVERDE

SECRETARIO
ING. AGR. Y MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

ii
**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION
VEGETAL**

ING. AGR. MSc. RAFAEL ANTONIO MENJIVAR ROSA.

DOCENTES DIRECTORES

ING. AGR. LEOPOLDO SERRANO CERVANTES

ING. AGR. REINA FLOR GUZMAN DE SERRANO

ING. AGR. DAGOBERTO PÉREZ

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*), es el alimento básico en los países desarrollados. Para el año 2002, se registro un área de siembra de 331 manzanas con rendimientos promedio de 340 quintales por manzana anualmente en la zona de Las Pilas, San Ignacio, Chalatenango, El Salvador, con una producción total de 112,553 quintales. *Bactericera cockerelli* es un insecto que afecta el cultivo de papa, provocando grandes perdidas por la enfermedad conocida como punta morada. El objetivo de la investigación fue determinar cual de los hongos entomopatógenos, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana* (BAZAM) y *Metarhizium anisopliae* (METAZAM) ejercía mejor biocontrol del insecto *Bactericera cockerelli* y fue realizada en el Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), de Enero a Diciembre de 2008. La investigación se realizó en tres fases, una de campo donde se recolecto el material y se hicieron bioensayos; otra de laboratorio en donde se hicieron pruebas de calidad y reproducción de los hongos, por ultimo una fase experimental en condiciones de laboratorio y análisis de los resultados, donde el hongo *Beauveria brongniartii* fue el mejor biocontrolador del insecto *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, presentando la mortalidad y agresividad mas alta, seguido por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

iv
AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo poderoso, a la Virgen María, al Espíritu Santo: por permitirnos gozar de buena salud, por cuidarnos y por darnos la perseverancia para terminar esta investigación y brindarnos la oportunidad de culminar con éxito nuestros estudios.

A los agricultores de la zona por habernos permitido el ingreso a sus parcelas y habernos dado su confianza para la realización de esta investigación.

A los asesores Ing. Agr. Leopoldo Serrano Cervantes, Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de Serrano e Ing. Dagoberto Pérez, por la paciencia mostrada hacia nosotros y habernos guiado en las decisiones tomadas en el transcurso del estudio que sin sus conocimientos científicos y experiencias en investigación no hubiéramos culminado con éxito.

Al Programa Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC) por el apoyo económico y logístico prestado, para la realización del estudio.

Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), por permitirnos el uso de las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Vegetal y el apoyo de su personal en especial a la Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de Serrano, por capacitarnos en el uso adecuado del equipo de laboratorio.

Al Ing. Agr. Martín Fuentes, Jefe de la Agencia de Extensión de CENTA “Las Pilas” y en especial al Sr. Alonso Huevo por brindarnos alojamiento en la Agencia durante la fase de campo de la investigación.

A la Ing. Agr. Josefina Terezón, al Ing. Agr. Mario Samayoa, Ing. Agr. Fredy Fuentes, Ing. Agr. Marcos Mejía, Dr. Mario Parada Jaco, Ing. Agr. Enrique Mancía, Ing. Agr. Olga Sandoval e Ing. Agr. Carlos Borja, por todo su apoyo técnico, logístico y científico brindado durante el desarrollo del estudio.

A nuestra querida Alma Mater por brindarnos toda nuestra formación académica, cultural y moral a través de la Facultad de Ciencias Agronómicas, para ser profesionales eficientes y capaces de desempeñarnos en la vida laboral.

A los docentes Ing. Agr. Daisy de solano, Lic. Rosmery de Erroa, Ing. Julia Amalia de Mejía, Ing. Agr. Miguel Hernández, Dr. Francisco Lara y Dr. Reinaldo Landaverde.

A todos los trabajadores (en especial a: Gonzalo Nerio, José M. Dueñas “Chemita”, Carlos Castillo “Carlitos”, Benjamín Sandoval “Luquitas”, don Felipe) de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

DEDICATORIA

- **A DIOS** todo poderoso, por haberme dado la sabiduría y fortaleza para concluir mis estudios universitarios.
- **A mi madre Yolanda Calderón**, por todo su amor, consejos, y apoyo incondicional durante la conducción de mis estudios.
- **A mis hermanas Leyla Calderón y Maritza Calderón**, por haber depositado su confianza en mí, sobre todo a ti Mary por todo tu apoyo y sacrificio.
- **A mi sobrino Dylan Zapata Calderón**, por llenarme de alegría y generar fortaleza en mí.
- **A los ingenieros (as)** de la facultad de Ciencias Agronómicas por sus oportunas orientaciones y sugerencias en mi formación.
- **A mis compañeros(as)** por su amistad, comprensión y alegría en mi estancia en la facultad, y en especial a mis compañeros de tesis **Alejandra Menjívar Silis, y Edgard Giovanni Núñez Martínez**

Gilmar Mauricio Mejía Calderón

DEDICATORIA

- **A Dios todopoderoso**, que me dio la oportunidad de vivir y estar a mi lado en todos los momentos; y brindarme la oportunidad de culminar con éxito mis estudios universitarios.
- **A mis padres, Yanira Guadalupe Silis Lemus y José Iván Menjívar Martínez** por haberme brindado apoyo incondicional. En especial mi madre gracias por todo tu esfuerzo.
- **A mis hermanos, Iván Leonel Menjívar Silis y Samuel Osvaldo Menjívar Silis** que siempre estuvieron conmigo para darme un consejo, confianza y palabras de aliento en todo momento.
- **A mis compañeros de tesis, Gilmar Mauricio Mejía Calderón y Edgard Giovanni Núñez Martínez**, por su comprensión y cariño brindado. Por sus sugerencias y ánimo para alcanzar las metas propuestas.

Alejandra Guadalupe Menjívar Silis

DEDICATORIA

- **A Dios** Todo poderoso, por permitirme gozar de salud y por iluminarme durante mi camino, por permitirme alcanzar el éxito de culminar mi carrera.
- **A mis padres Edgar Oswaldo Núñez y Gloria Alicia Martínez**, por todo su apoyo, comprensión y sacrificio que realizaron durante mi formación académica y personal y sobre todo por creer en mi.
- **A mis hermanas Susana Yessenia Núñez Martínez y Xiomara Lisethe Núñez Martínez**, por brindarme todo su apoyo y servirme de ejemplo para ser una persona de éxito por compartir con migo los mejores momentos.
- **A mis abuelos Guadalupe Martínez (Q. D. D. G.) y Alicia de Martínez**, por servirme de inspiración y brindarme su apoyo en todo momento.
- **A mis tíos Dr. Miguel Martínez y Dra. Sandra Martínez**, por toda su confianza depositada en mí para alcanzar mis sueños profesionales y servirme de ejemplo.
- **A todos mis amigos de la Universidad**, en especial a Nuvia García, Noemí Monico (buby), Enmanuel Cuadra (kiko), Daniel Yáñez, Bernardo Romero, Jesús Puente, Carlos Villegas (chucho), Carlos Chirino, Dalila Vega.
- **A mis compañeros de tesis, Alejandra Silis y Gilmar Calderón**, por todos los momentos que pasamos y que a pesar de todo logramos salir adelante, por su apoyo y confianza.
- **A mis amigas**, Liseth Magaña, Edith Rivera, Delmy Varela, por apoyarme en todo momento, dedicarme parte de su tiempo y depositar su confianza en mí les deseo éxitos en su vida y que Dios las proteja siempre.

Edgard Giovanni Núñez Martínez.

INDICE

Nº	CONTENIDO	PAG.
	RESUMEN.....	iv
	INDICE DE CUADROS.....	xv
	INDICE DE FIGURAS.....	
	xvii	
	INDICE DE ANEXOS.....	xx
1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1	ORIGEN DEL CULTIVO DE PAPA.....	3
2.1.1	Generalidades.....	3
2.1.2	Descripción botánica.....	3
2.1.3	Época de siembra.....	4
2.1.4	Principales plagas y enfermedades del cultivo de papa.....	4
2.1.4.1	Síntomas asociadas a fitoplasmas.....	4
2.1.4.2	Hongos fitopatógenos.....	5
2.1.4.3	Bacterias.....	7
2.1.4.4	Otros daños en el cultivo.....	7
2.2	<i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i> EN EL CULTIVO DE PAPA.....	7
2.2.1	Clasificación taxonómica del insecto.....	8
2.2.2	Descripción morfológica del insecto.....	9
2.2.3	Hospederos.....	9
2.2.4	Daños en los cultivos.....	10
2.2.5	Descripción de la enfermedad punta morada.....	10
2.2.5.1	Sintomatología en tomate.....	11
2.2.5.2	Sintomatología en papa.....	12
2.3	FITOPLASMA.....	13
2.3.1	Características de los fitoplasmas.....	13
2.3.2	Fitoplasmas en papa: Enfermedades y síntomas.....	14
2.3.3	Vectores.....	14
2.3.4	Interacción patógeno – vector.....	15
2.4	CONTROL BIOLÓGICO.....	15
2.5	HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	15

2.5.1 Características que favorecen a los Hongos	
Entomopatógenos.....	16
2.5.2 Clasificación taxonómica de los Hongos	
Entomopatógenos.....	17
2.5.3 Características de los hongos de la Subdivisión	
Deuteromycotina.....	17
2.5.4 Características morfológicas de la Clase	
Hyphomycetes.....	17
2.5.5 Modo de acción de los hongos entomopatógenos.....	18
2.5.6 Producción de Hongos Entomopatógenos.....	19
2.5.7 Medios de Cultivo.....	19
2.5.8 Formulaciones de Hongos Entomopatógenos.....	20
2.5.9 Reactivación de los Hongos Entomopatógenos.....	21
2.6 <i>Cladosporium sp.</i>	21
2.6.1 Clasificación taxonómica.....	21
2.6.2 Características.....	21
2.7 <i>Paecilomyces spp.</i>	22
2.7.1 Clasificación taxonómica.....	22
2.7.2 Características.....	22
2.7.3 Plagas que controla	22
2.7.4 Modo de acción.....	23
2.8 <i>Beauveria bassiana</i>	23
2.8.1 Clasificación taxonómica.....	23
2.8.2 Características.....	23
2.9 <i>Beauveria brongniartii</i>	24
2.9.1 Clasificación taxonómica.....	24
2.9.2 Características.....	24
2.10 <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
2.10.1 Clasificación taxonómica.....	25
2.10.2 Características	26
3. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
3.1.1 Hongos entomopatógenos (HEP).....	26
3.2 UBICACIÓN.....	28
3.2.1 Bioensayos preliminares.....	28

3.2.2 Ensayo estadístico.....	28
3.3 DURACIÓN.....	28
3.4 FASE DE CAMPO (RECOLECCIÓN DE INSECTOS, BIOENSAYOS).....	28
3.4.1 Muestreo de parcelas.....	28
3.4.2 Densidad de población de la plaga <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i>	29
3.5 BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	29
3.5.1 Primer bioensayo.....	30
3.5.2 Segundo Bioensayo.....	32
3.6 FASE DE LABORATORIO.....	33
3.6.1 Observación de material experimental.....	33
3.6.2 Observación de muestras en microscopio estereoscopio.....	33
3.6.3 Observación de muestras en microscopio compuesto.....	33
3.6.4 Aislamiento de insectos.....	34
3.7 FASE EXPERIMENTAL EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	35
3.7.1 Pruebas de requerimiento de calidad.....	35
3.7.2 Reproducción de hongos en arroz.....	37
3.7.3 Obtención de esporas.....	38
3.7.4 Preparación de suspensiones acuosas de hongos entomopatógenos para evaluar la ineffectividad.....	39
3.8 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	40
3.8.1 Factor en estudio.....	40
3.8.2 Unidad experimental.....	40
3.8.3 Diseño estadístico.....	40
3.8.4 Descripción de los tratamientos.....	40
3.8.5 Distribución estadística.....	41
3.8.6 Coeficiente de variabilidad.....	41
3.8.7 Distribución al azar de tratamientos.....	42
3.8.8 Hipótesis científica.....	43
3.8.9 Hipótesis estadística.....	43
3.8.10 Variables evaluadas.....	43
3.9 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	44
3.9.1 Toma de datos.....	44
3.9.2 Lecturas de mortalidad aparente del insecto.....	44

3.9.3 Lecturas de mortalidad real.....	45
3.9.4 Lecturas de crecimiento de colonia del hongo.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1 CONDICIONES CLIMATICAS DE LOS LUGARES DE ESTUDIO.....	46
4.2 COMPORTAMIENTO DE LOS HONGOS UTILIZADOS EN BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	46
5. ANALISIS DE RESULTADOS.....	52
5.1 POTENCIALIDAD DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EVALUADOS COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE <i>BACTERICERA COCKERELLI</i>	52
5.1.1 Mortalidad aparente de <i>Bactericera cockerelli</i> . (Primera lectura: cinco días después de la aplicación de los tratamientos).....	52
5.1.2 Mortalidad aparente de <i>Bactericera cockerelli</i> (segunda lectura: diez días después de la aplicación de los tratamientos).....	53
5.1.3 Mortalidad real de <i>Bactericera cockerelli</i> (primer lectura: cuatro días después del aislamiento del insecto en medio de cultivo PDA).....	54
5.1.4 Mortalidad real de <i>Bactericera cockerelli</i> (segunda lectura: ocho días después del aislamiento del insecto en medio de cultivo PDA).....	56
5.1.5 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Primera lectura: tres días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).....	57
5.1.6 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Segunda lectura: cinco días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).....	58
5.1.7 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Tercera lectura: siete días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).....	60
5.2 <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i> en chile dulce.....	61

5.2.1 Parasitóides de ninfas de <i>Bactericera</i> <i>(Paratrioza) cockerelli</i>	62
5.2.2 <i>Cladosporium sp</i> en moscas.....	63
5.2.3 Inóculos del hongo <i>Cladosporium sp</i> <i>en plantas de tomate</i>	65
6. CONCLUSIONES.....	66
7. RECOMENDACIONES.....	67
8. BIBLIOGRAFIA.....	68
9. ANEXOS.....	74

INDICE DE CUADROS

Nº	CONTENIDO	PAG.
1	Distribución estadística utilizada en el experimento.....	41
2	Significancia del coeficiente de variabilidad.....	42
3	Tratamientos del ensayo ubicados de forma azarizada.....	42
4	Rangos de temperatura y humedad relativa.....	46
5	Comportamiento de los 8 hongos entomopatógenos utilizados sobre <i>Bactericera cockerelli</i> en los bioensayos.....	47
6	Efecto de la mortalidad de los hongos entomopatógenos durante los Bioensayos.....	51
A1	Variedades y mejoramiento genético de papa.....	79
A 2	Hoja de toma de datos de ensayo estadístico.....	80
A 3	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente primera lectura.....	81
A 4	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente segunda lectura.....	81
A 5	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia primera lectura 1mm.....	81
A 6	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia segunda lectura 2mm.....	81
A 7	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia tercera lectura 3mm.....	82
A 8	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Real primera lectura.....	82
A 9	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Real segunda lectura.....	82
A 10	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de mortalidad aparente (segunda lectura).....	83
A 11	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Diámetro de colonia (segunda lectura).....	83

A 12	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
	para la variable Diámetro de colonia (Tercera lectura).....	83
A 13	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
	para la variable Mortalidad real (Primera lectura).....	84
A 14	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
	para la variable Mortalidad real (Segunda lectura).....	84

INDICE DE FIGURAS

Nº	CONTENIDO	PAG.
1	Síntomas asociadas a fitoplasmas transmitido por <i>Bactericera cockerelli</i> en el cultivo de papa.....	4
2	Daño en follaje y tubérculo provocado por <i>Phytophthora infestans</i> en papa.....	5
3	Esporas de <i>Alternaria sp.</i> y daño causado en follaje de papa.....	5
4	Daño en follaje de papa causado por <i>Oidium sp.</i>	6
5	Marchites de la planta y pudrición de tubérculos de papa causado por <i>Fusarium sp.</i>	6
6	Pudrición del tallo de una planta de papa ocasionado por <i>Rhizoctonia sp.</i>	6
7	Daños ocasionados por bacterias en el cultivo de papa.....	7
8	Daños en tubérculos de papa.....	7
9	Adulto de <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i>	8
10	Huevos de <i>Paratrioza</i>	9
11	Ninfa de <i>Paratrioza</i>	9
12	Ciclo biológico de <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i>	10
13	Formación de tubérculos aéreos.....	11
14	Marchites de plantas post infestación.....	11
15	Planta de tomate infectada por fitoplasmas.....	12
16	Planta de papa infectada por fitoplasmas, producción de tubérculos aéreos.....	12
17	Muestreo en parcelas.....	29
18	Muestreo de poblacional de insectos.....	29
19	Equipo de recolección de insectos.....	30
20	Recolección de insectos.....	30
21	Preparación de suspensión con el entomopatógeno.....	31
22	Introducción de insectos en caja Petri.....	32
23	Sellado de cajas Petri con parafilm.....	32
24	Manipulación de HEP dentro de una cámara de inoculación Artesanal.....	32

25	Observación de muestras de bioensayos en microscopio	
	Estereoscopio.....	33
26	Observación de muestras en microscopio compuesto.....	34
27	Aislamiento de insectos en cámara de flujo laminar.....	34
28	<i>Bactericera cockerelli</i> infectada por <i>Beauveria brongniartii</i>	35
29	Prueba de germinación de esporas.....	36
30	Conteo de esporas de <i>Metarrhizium anisopliae</i> (METAZAM) en cámara de Neubauer para la prueba de concentración de conidias/ml.....	37
31	Procedimiento para la reproducción de los Hongos Entomopatógenos en arroz.....	38
32	Obtención de esporas de <i>Beauveria brongniarti</i>	39
33	Preparación de la suspensión de los HEP y Aplicación de la suspensión de HEP.....	39
34	Unidad experimental: insectos adultos de <i>Bactericera (Paratrioza)</i> <i>cockerelli</i> en cajas Petri.....	40
35	Tratamientos utilizados en el diseño.....	41
36	Instalación del ensayo experimental.....	43
37	Lecturas de temperatura y observación de tratamientos.....	44
38	Lecturas de mortalidad aparente de los tratamientos.....	45
39	Lecturas de mortalidad real, tratamientos observados en microscopios estereoscopio y compuesto.....	45
40	Crecimientos de colonias <i>Metarrhizium anisopliae</i> de observado a simple vista.....	46
41	Insecto adulto de <i>Bactericera</i> cubierto con micelio del hongo <i>B. brongniartii</i>	48
42	<i>Bactericera</i> adulta con micelio del hongo <i>Paecilomyces lilacinus</i> (PAZAM).....	48
43	Insecto adulto de <i>Bactericera</i> cubierto con micelio del hongo <i>M. anisopliae</i> (METAZAM).....	48
44	Ninfa de <i>Bactericera</i> cubierta con micelio del hongo <i>B. bassiana</i> (BAZAM).....	49
45	Huevos de <i>Bactericera cockerelli</i> infectados por <i>B. brongniartii</i>	49
46	Ninfas de <i>Bactericera cockerelli</i> infectados por <i>B. brongniartii</i>	50
47	Adulto de <i>Bactericera cockerelli</i> infectado por <i>B. brongniartii</i>	50
48	Crecimiento de las colonias en medio de cultivo PDA.....	51

49	Porcentaje de mortalidad aparente de <i>Bactericera cockerelli</i> ocasionada por los entomopatógenos en estudio, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Primera lectura).....	53
50	Porcentaje de mortalidad aparente de <i>Bactericera cockerelli</i> ocasionada por los entomopatógenos en estudio, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Segunda lectura).....	54
51	Porcentaje de mortalidad real de <i>Bactericera cockerelli</i> ocasionada por los entomopatógenos en estudio, aislamientos de los insectos en medio de cultivo PDA, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Primera lectura).....	55
52	Porcentaje de mortalidad real de <i>Bactericera cockerelli</i> ocasionada por los entomopatógenos en estudio, aislamientos de los insectos en medio de cultivo PDA, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Segunda lectura).....	57
53	Diámetros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros tres días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.....	58
54	Diámetros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros cinco días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.	59
55	Diámetros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros siete días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.	61
56	<i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i> afectando plantaciones de chile dulce.....	62
57	Ectoparasitoides de ninfas de <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i>	63
58	Moscas muertas sin identificar infectadas por <i>Cladosporium sp</i>	64
59	Estructuras del hongo <i>Cladosporium sp</i> encontrado parasitando moscas sin identificar.....	64
60	Inóculos del hongo <i>Cladosporium sp</i> parasitando mosca blanca.....	65

INDICE DE ANEXOS

N°	CONTENIDO	PAG.
1	Semilla de papa.....	75
2	Ciclo biológico de <i>Bactericera cockerelli</i> observado en campo.....	75
3	Síntomas de fitoplasma observados en campo.....	76
4	Mecanismo de adquisición de virosis y fitoplasma por los áfidos (a) Virus transportados por el estilete, tipo no persistente (b) virus de tipo circulativo o persistentes.....	76
5	Modo de acción de los hongos entomopatógenos.....	77
6	Pasos para el montaje de bioensayos.....	77
A1	Variedades y mejoramiento genético de papa.....	79
A 2	Hoja de toma de datos de ensayo estadístico.....	80
A 3	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente primera lectura.....	81
A 4	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente segunda lectura.....	81
A 5	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia primera lectura 1mm.....	81
A 6	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia segunda lectura 2mm.....	81
A 7	Análisis de varianza Variable: Diámetro de micelio de colonia tercera lectura 3mm.....	82
A 8	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Real primera lectura.....	82
A 9	Análisis de varianza Variable: Porcentaje de Mortalidad Real segunda lectura.....	82
A 10	Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de mortalidad aparente (segunda lectura).....	83

A 11 Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
para la variable Diámetro de colonia (segunda lectura).....	83
A 12 Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
para la variable Diámetro de colonia (Tercera lectura).....	83
A 13 Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
para la variable Mortalidad real (Primera lectura).....	84
A 14 Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza	
para la variable Mortalidad real (Segunda lectura).....	84

1- INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum*), es el cuarto cultivo sembrado en más de 100 países y es el alimento básico de los países desarrollados. A nivel mundial, se producen 290 millones de TM y se cultivan 13.85 millones de ha. Para el año 2007, se registro una siembra de 331 manzanas con un rendimiento promedio de 340 quintales por manzana anualmente en la zona de Las Pilas, (2000 a 2400 msnm) San Ignacio, Chalatenango, con una producción de total de 112,553 quintales y lo que representa el 12.7 % del consumo local, por lo cual hay necesidad de importar papa para cubrir la demanda nacional. (DISAGRO, s.f.)

En el año 1998 a consecuencia del fenómeno natural “Huracán Mitch”, se desato el brote de la plaga (*Bactericera cockerelli*) que hasta esa fecha no se consideraba como plaga del cultivo ya que no se reportaban perdidas y se conocía poco sobre sus características y biología de dicho insecto. Actualmente se ha convertido en una plaga que puede ocasionar pérdidas considerables en la producción de papa, por lo que en el año 2007 se desarrollo un estudio sobre el insecto, investigando los “Síntomas asociados a cuatro niveles de infestación de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en *Solanum tuberosum*” por Estrada y Rico¹.

Bactericera cockerelli es un insecto que afecta considerablemente el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), provocando grandes perdidas a los productores por la enfermedad conocida como punta morada, derivada de la infestación por la plaga *Bactericera cockerelli*. Durante la realización del estudio desarrollado por Estrada y Rico en Las Pilas, Departamento de Chalatenango, se observaron insectos adultos de *Bactericera cockerelli* parasitados por un hongo en un cultivo de tomate, encontrado por Miguel Estrada, el cual fue identificado posteriormente como *Cladosporium sp* por la Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de Serrano, Jefe de Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), en el Laboratorio de dicha institución; sin embargo se desconoce la acción que este tiene sobre el insecto. (Guzmán de Serrano, 2007).

¹ Estrada, MWJ. 2007. Evaluación de *Bactericera* (entrevista). San Salvador, ES, Universidad de El Salvador.

En la actualidad se conocen una serie de hongos que son utilizados como controladores biológicos de ciertas plagas insectíles, como por ejemplo *Paecilomyces sp.* y *Beauveria sp* sobre Mosca blanca, Picudos cocoteros y áfidos. Con respecto al género *Cladosporium*, este engloba unas 40 especies, algunas de ellas fitopatógenas y la mayoría saprofitas sobre vegetación o sobre el suelo, algunas de sus especies actúan como oportunistas. (CATIE. 2000).

En la presente investigación realizada de Enero a Diciembre de 2008, se evaluó diferentes hongos entomopatógenos, cuatro géneros y siete especies, sobre el insecto *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* entre estos *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a nivel de laboratorio. Con el objetivo de determinar cual de los entomopatógenos realizaba un mejor biocontrol sobre el insecto. Se realizaron bioensayos para seleccionar tres de las especies de entomopatógenos y evaluarlas en un ensayo estadístico en laboratorio.

2- REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 ORIGEN DEL CULTIVO DE PAPA

Según Henkes y Dunn (1981) citados por Blanco Pineda (2002). Su origen se sitúa en la región andina de Sudamérica, en las altas mesetas de la cordillera de los Andes. Las primeras siembras estuvieron cercanas a las orillas del lago Titicaca, entre las fronteras de Perú y Bolivia. A partir de Sudamérica se diseminó la siembra a casi todo el mundo.

A lo largo de toda la cordillera andina encontramos una gran variabilidad de especies y entre ellas 176 son silvestres y sólo siete son cultivadas. La especie cultivada y de uso actual cosmopolita, corresponde a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, la que habría evolucionado en el sur de Chile y en Europa. (Contreras. s.f.). (Ver anexo 1)

2.1.1 Generalidades

La papa (*Solanum tuberosum*), es el cuarto cultivo sembrado en más de 100 países y es el alimento básico de los países desarrollados. A nivel mundial, se producen 290 millones de TM y se cultivan 13.85 millones de hectáreas. Para el año 2002, se registró la siembra de entre 420 a 560 hectáreas anuales en la zona de Las Pilas, (2000 a 2400 msnm) San Ignacio, Chalatenango, producción que sólo cubre el 20 % de la demanda total, por lo cual hay necesidad de importar papa, para cubrir la demanda nacional. (Cortéz y Hurtado.2002).

2.1.2 Descripción botánica

La patata es planta herbácea anual. Sus raíces son muy ramificadas, finas y largas, su desarrollo depende de que el suelo esté o no mullido. Las hojas son imparipinnadas; consta de nueve o más folíolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción. El fruto es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar. El tallo es grueso, fuerte, anguloso y con una altura que varía entre 0,5 y 1 m, se origina en las yemas del tubérculo. A la vez que posee tallos aéreos, la planta tiene tallos subterráneos; los primeros son de color verde; los tallos subterráneos o estolones son relativamente cortos, se convierten en su extremidad en tubérculos. En la superficie de los tubérculos tienen yemas distribuidas en forma helicoidal, abundando sobre todo en la parte opuesta al punto de inserción sobre el estolón. Aunque la patata puede multiplicarse por semillas (ver anexo 2) y por esquejes, en la práctica, la multiplicación es siempre vegetativa, haciéndose por medio de los tubérculos que producen brotes en las yemas u ojos. La germinación de la patata, su crecimiento y la producción de tubérculos depende de sustancias químicas elaboradas por la patata, que actúan en dosis muy débiles. Se les conoce con el nombre de "sustancias de

tuberización”. La formación de sustancias de tuberización por hojas y tallos depende de la variedad y, también, de la temperatura y de la duración de la luz diaria (fotoperiodo). En días cortos se producen más sustancias de tuberización que en días largos, en los cuales aumenta el crecimiento vegetativo de la planta. (Infoagro s.f.)

2.1.3 Época de siembra

En El Salvador, en la zona de Las Pilas, Departamento de Chalatenango, la papa puede ser cultivada todo el año, la temperatura nocturna del lugar siempre es menor de 18AC y mayor de 18AC durante el día. En Zapotitán, Ciudad Arce, Departamento de La Libertad, situado a 460 msnm, la papa puede cultivarse sólo durante la época seca (noviembre a febrero) cuando las temperaturas son frescas durante la noche (llegan hasta unos 15AC), y durante el día, hasta 30AC. (Cortéz y Hurtado, 2002).

2.1.4 Principales plagas y enfermedades del cultivo de papa

Según Guzmán de Serrano (2008), el cultivo de papa se ve atacado seriamente por diversos organismos fitopatológicos, entre ellos, bacterias, hongos, nematodos, virus y fitoplasma; causantes de enfermedades en este cultivo en la zona alta de Chalatenango. Algunas de estas enfermedades son:

2.1.4.1 Síntomas asociadas a fitoplasmas

- Mediante análisis de PCR se demostró que *Bactericera cockerelli* es el transmisor de fitoplasmas en el cultivo de papa. (Fig. 1)

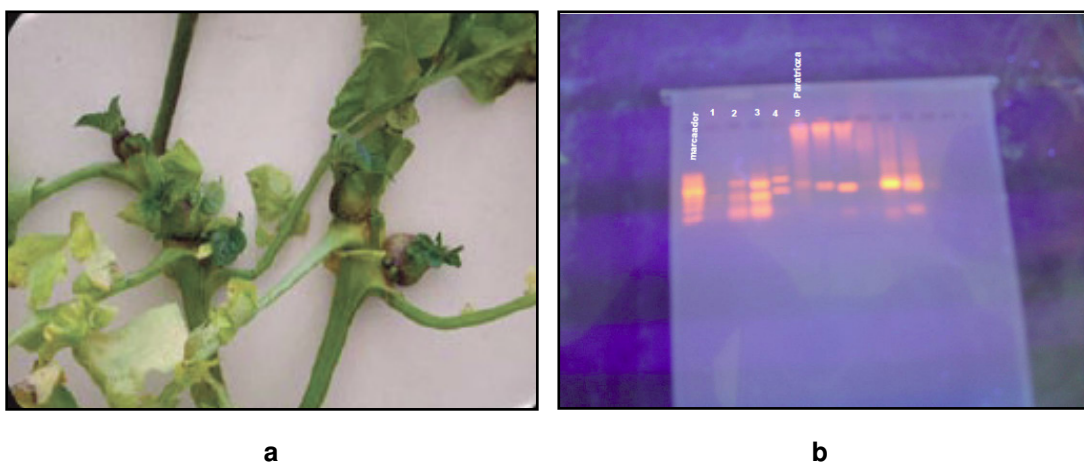


Fig. 1. Síntomas asociadas a fitoplasmas transmitido por *Bactericera cockerelli* en el cultivo de papa: a) Amarillamiento y tubérculos aéreos en papa producidos por fitoplasma. b) Análisis de PCR y Electroforesis en adultos de *Paratrioza cockerelli* con resultado positivo.

2.1.4.2 Hongos fitopatógenos

- Tizón Tardío provocado por *Phytophthora infestans* diferentes especies de *Alternaria* (Fig. 2) localizadas en la zona alta de Chalatenango; es una enfermedad que ataca severamente al cultivo, dañando las hojas, tallo y tubérculos hasta destruir la planta. (Fig. 3)



Fig. 2. Daño en follaje y tubérculo provocado por *Phytophthora infestans* en papa.



Fig. 3. Esporas de *Alternaria sp.* y daño causado en follaje de papa.

- Mildiu polvoso, enfermedad producida por *Oidium sp.*, el cual causa necrosis en las hojas, impidiendo el proceso de fotosíntesis, por lo cual la planta se debilita y muere. (Fig. 4)



Fig. 4. Daño en follaje de papa causado por *Oidium sp.*

- *Fusarium sp.*, provoca severos daños en hojas, tallo y tubérculos, afectando el rendimiento de las plantas. (Fig. 5)



Fig. 5. Marchites de la planta y pudrición de tubérculos de papa causado por *Fusarium sp.*

- *Rhizoctonia sp.* este patógeno ataca el tallo de las solanáceas ocasionando la enfermedad de “mal del talluelo”, produciendo pudrición del tallo. (Fig. 6)



Fig. 6. Pudrición del tallo de una planta de papa ocasionado por *Rhizoctonia sp.*

2.1.4.3 Bacterias

- Entre las bacterias que afectan el cultivo de papa produciendo daños en hojas, tallos y tubérculos, se mencionan s: *Ralstonia sp*, *Xanthomona sp*, *Streptomyces cabies*. (Fig. 7)

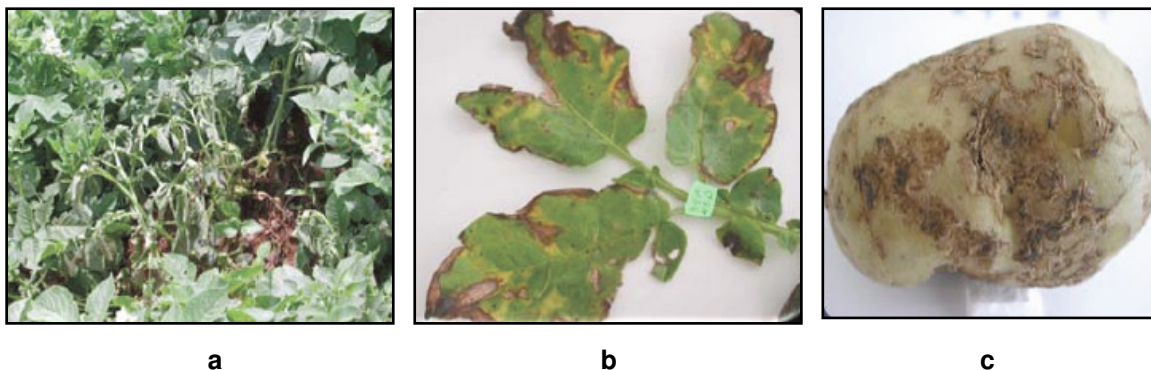


Fig. 7. Daños ocasionados por bacterias en el cultivo de papa: a) Marchites bacteriana ocasionada por *Ralstonia sp*; b) Manchas foliares ocasionadas por *Xanthomona sp*; c) Halo necrótico interno del tubérculo ocasionada por *Streptomyces cabies*.

2.1.4.4 Otros daños en el cultivo

El cultivo de papa también se ve afectado por problemas genéticos y ambientales. (Fig. 8)



Fig. 8. Daños en tubérculos de papa: a) estrés hídrico; b) problemas genéticos.

2.2 *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* EN EL CULTIVO DE PAPA

Esta especie también conocida con los nombres de “pulgón saltador”, “psilido del tomate”, o simplemente “salerillo”, es un insecto que actualmente pertenece a la familia Triozidae; superfamilia Psylloidea; suborden Homoptera; orden Hemiptera. Este insecto fue descubierto en 1909 por Cockerell en el estado de Colorado (USA) y, como reconocimiento, Sulc (1909) propuso el nombre científico *Trioza cockerelli*, aunque mas

tarde se confirmó taxonómicamente como *Paratrioza cockerelli*; se le conoce también con el nombre de psílido, por su anterior clasificación dentro de la familia Psyllidae. Recientemente el género de esta especie se ha revisado y se le ha denominado con el nombre de *Bactericera cockerelli*. (Covarrubias, 2005).

En México se documentó la presencia del salerillo, *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, en 1947, con efecto en solanáceas en Durango, Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas. A partir de los 70 esta especie es una plaga primaria de la papa, y jitomate. *B. cockerelli* ocasiona daños directos a la planta al succionar la savia e indirectos al transmitir fitoplasmas. Dichos fitoplasmas producen la enfermedad punta morada en papa o permanente del tomate en jitomate. (Rodríguez, 2008.). En El Salvador es el psílido de la papa (Fig. 9) es una de las plagas de mayor importancia económica. En el año 2000, apareció en la zona de las Pilas, Chalatenango, la plaga conocida como “Psílido de la papa y tomate” (*Paratrioza cockerelli*) vector del fitoplasma causante de la enfermedad conocida como punta morada, debido a la sintomatología que presentan las plantas afectadas por esta enfermedad. (Cortéz, 2001).



Fig. 9. Adulto de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*.

2.2.1 Clasificación taxonómica del insecto

Reino: Animal

Phylum: Artrópoda

Clase: Insecta

Orden: Homoptera

Familia: *Psyllidae, Chermidae*

Género: *Bactericera (Paratrioza)*

Especie: *cockerelli*

(MARN-IABIN, 2001)

2.2.2 Descripción morfológica del insecto

Marin et al., (1995), citado por Covarrubias, (2005), describe al insecto partiendo de los huevecillos de forma ovoide, de color anaranjado- amarillento, corion brillante, presentando en uno de sus extremos un pequeño filamento, con el cual se adhieren a las superficies de las hojas (Fig. 10). Presenta cinco estadios ninfales con forma oval, aplanados dorso-ventralmente, con ojos bien definidos. (Fig. 11) Los adultos al emerger presentan una coloración verde-amarillenta; son inactivos, alas blancas, que al paso de 3 ó 4 horas se tornan transparentes. La coloración del cuerpo pasa de ligeramente ámbar a café oscuro o negro.



Fig. 10. Huevos de *Paratrioza*.



Fig. 11. Ninfa de *Paratrioza*.

2.2.3 Hospederos

Según Pletsch, (1947) y Wallis, (1955), citados por Covarrubias, (2005), el psylido de la papa tiene un amplio rango de hospedantes cultivados y silvestres. Este insecto ataca a las solanáceas, principalmente chile (*Capsicum spp*), papa (*Solanum tuberosum*), jitomate (*Lycopersicum esculentum*) y tomate de cáscara (*Pysallis sp*) son de los mas preferidos por las hembras para depositar sus huevecillos y desarrollar sus poblaciones. Se considera que el ciclo biológico (Fig. 12) (ver anexo 3) de este insecto no varía en los cultivos de papa y tomate, sin embargo, el estado ninfal es más prolongado en aquellas especies de plantas que no pertenecen a las familias antes mencionadas: tal es el caso de algunas especies de malezas que no son hospederas.

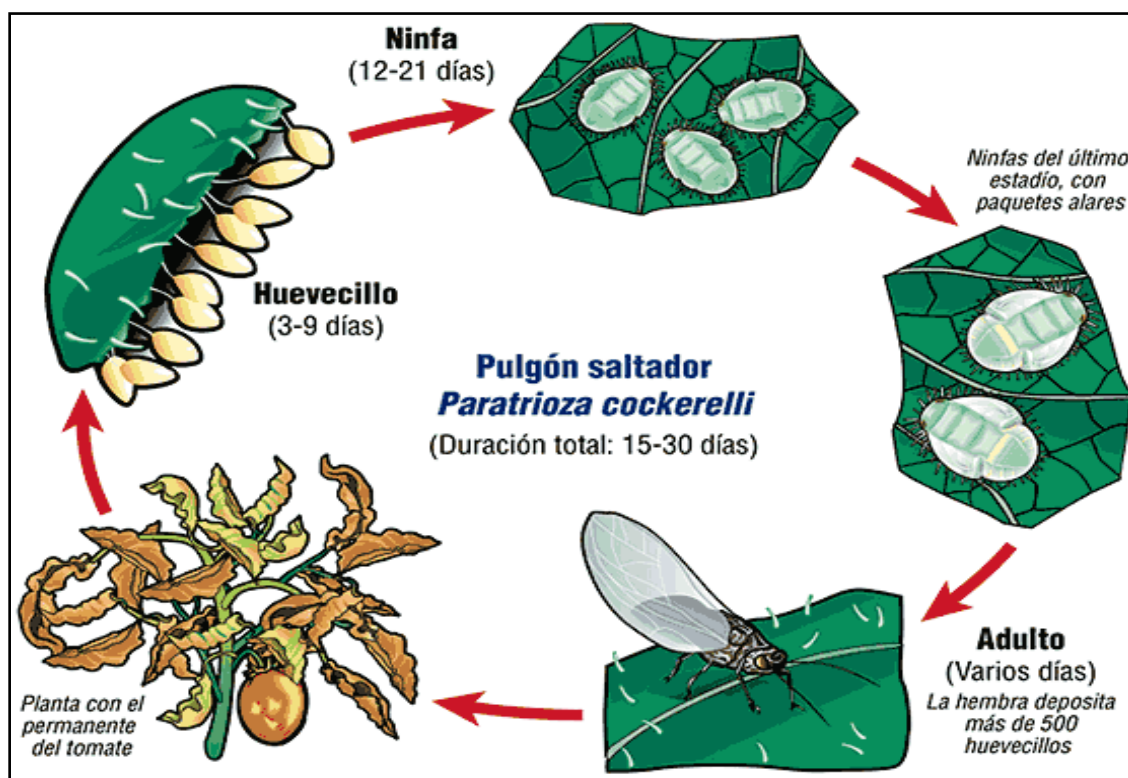


Fig. 12. Ciclo biológico de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Bayer CropScience, s.f.)

2.2.4 Daños en los cultivos

Garzón, (2002), citado por Covarrubias, (2005) afirma que existen dos tipos de daños: el toxinífero o directo y el indirecto como transmisor de fitoplasmas. La toxina en la saliva de *P. cockerelli* es una sustancia que daña a las células que producen clorofila en las hojas de las plantas y que dan el color verde a estas, lo que hace que las plantas se vean amarillentas y raquíticas. Es en la etapa de ninfa que el insecto causa el daño. El mismo es causado por una toxina que las ninfas inyectan en las plantas cuando se están alimentando. Esta toxina causa trastornos fisiológicos en las plantas que afectan su desarrollo, rendimiento y la calidad de la producción.

2.2.5 Descripción de la enfermedad punta morada

Carter, (1950) y Daniels, (1954) citados por Panames, (s.f.) afirman que la punta morada es causada por una toxemia clorótica, que se produce cuando el insecto se alimenta de las plantas. La producción de los síntomas generalmente se reportan, que se limitan a la alimentación de estados ninfales del insecto. En condiciones de campo, los síntomas pueden aparecer dentro de los siguientes cuatro a seis días después de la alimentación de un gran número de psilidos.

Es una enfermedad de etiología compleja en la que participan principalmente microorganismos llamados fitoplasmas y en menor grado hongos y virus, se ha detectado en solanáceas, se desconoce en forma fundamentada aspectos de transmisión y combates. (Flores. et al. s.f)

Según Estrada y Rico, (2008), durante la investigación “Síntomas asociados a cuatro niveles de infestación de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en *Solanum tuberosum*” evaluando el “Complejo de síntomas desarrollados en plantas de papa por la infestación de ninfas de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*” observaron que el desarrollo de los cambios fisiológicos en las plantas de papa infestadas por ninfas de *Paratrioza cockerelli* comienza ocho días después que las ninfas fueron colocadas en las plantas. El primer síntoma más notorio fue el apareamiento de tubérculos aéreos, (Fig. 13) que se observaron a los 15 días, aumentando con el tiempo, estabilizándose en un periodo de 30 a 45 días. Seguido a los tubérculos aéreos, la planta manifestó brotación excesiva, entre nudos cortos en zigzag, nudos engrosados; meristemo y axilas apicales de la planta engrosados, las hojas viejas y nuevas se vuelven rugosas y se enrollan hacia arriba, en algunos casos los bordes de las hojas apicales cambiaron su tonalidad de verde a púrpura ó amarillenta. En un periodo de 35 a 45 días post infestación de ninfas, las plantas comenzaron a marchitarse (Fig. 14). De 65 a 75 días de haber sido colocadas las ninfas la planta murió.



Fig. 13. Formación de tubérculos aéreos.

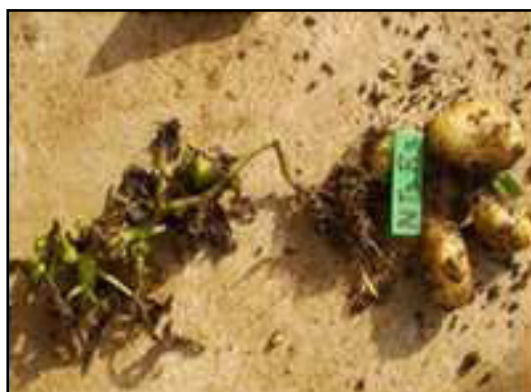


Fig. 14. Marchites de plantas post infestación.

2.2.5.1 Sintomatología en tomate

En el tomate, las hojas del ápice o cogollo se tornan de color morado, enrollándose hacia el haz y sufriendo una deformación las cuales se vuelven de menor tamaño y ancho que las hojas normales (Fig. 15). Si la planta adquiere la enfermedad desde el semillero no habrá producción, si la adquiere después de transplantada la reducción en la cosecha podrá llegar hasta un 60%, afectándose en calidad y cantidad la producción (Cortéz. 2001).



Fig. 15. Planta de tomate infectada por fitoplasmas

2.2.5.2 Sintomatología en papa

Las plantas infestadas inicialmente presentan un hábito de crecimiento erecto, principalmente en las hojas más jóvenes. Los folíolos se enrollan hacia el haz, iniciándose en su base, puede además, adquirir una pigmentación amarilla o púrpura. El tallo presenta un aspecto más leñoso y puede haber abultamiento de los nudos, en ocasiones los entrenudos son más cortos y pueden presentarse tubérculos aéreos. (Fig.16) Cuando la población de ninfas es muy alta, la planta presenta un color amarillo y termina por secarse. En la parte subterránea se puede apreciar una decoloración cortical y los tubérculos pueden deformarse o desarrollarse muy pegados al estolón, lo que da una apariencia de rosario. En algunas variedades el número de tubérculos puede incrementarse, pero no alcanzan el tamaño comercial. En el interior del tubérculo se presenta una coloración parda, que en muchos casos es tan severa que imposibilita su consumo. Por otro lado, los tubérculos afectados emiten brotes ahilados o finos, y muchos de ellos definitivamente no brotan. Cuando los brotes envejecen puede formarse en su ápice pequeños tubérculos, que pueden ir de 5 a 15 mm de diámetro. (Cortéz y Hurtado. 2002).



Fig. 16. Planta de papa infectada por fitoplasmas, producción de tubérculos aéreos, (Estrada y Rico, 2008)

2.3 FITOPLASMA

Los fitoplasmas son microorganismos que fueron previamente considerados "organismos parecidos a micoplasmas" (MLO's). Estos microorganismos son pleomórficos y en condiciones naturales son transmitidos por cigarritas de la familia *Cicadellidae*, aunque aparentemente la familia *Psyllidae* contiene algunos vectores. En papa causan enfermedades como la punta morada, "stolbur" o escoba de bruja, las cuales se han visto diseminadas en los últimos años en varios países. (Salazar. s.f.)¹

Por otro lado Lee y Davis, (1986), citados por Covarrubias, (2005), dicen que el fitoplasma es un organismo infeccioso, submicroscópico, procariote endocelular, y esta incluido dentro de la clase Mollicutes, carece de pared celular, es un parásito obligado y esta limitado al nivel del floema y no es posible cultivarlos in Vitro.

El fitoplasma (en latín: Phytoplasma), es un parásito de las plantas, en la cual su supervivencia es posible solo en el interior de las plantas huéspedes. Los fitoplasmas son considerados formas intermedias entre las entidades virales y las bacterias. Son organismos de dimensiones similares a los virus y en consecuencia, como los virus, muchos de ellos atraviesan los filtros bacteriológicos. (Wikipedia, s.f.)¹

2.3.1 Características de los fitoplasmas

Las enfermedades causadas por organismos parecidos a micoplasmas (MLO), ahora denominados fitoplasmas, se consideraban causadas por virus con características poco usuales hasta 1967, cuando Doi *et al.* (1967) citado por Salazar, (s.f), demostraron la presencia de organismos tipo micoplasmas en el floema de plantas infectadas con el enanismo del "mulberry", escoba de brujas de la papa, amarillamiento del aster o escoba de brujas de Paulownia. Estos organismos se hallan en las células cribosas del floema y aparentemente en raras ocasiones en células del parénquima floemático de las plantas infectadas. Los fitoplasmas son organismos pleomórficos, sin pared celular, y están rodeados de una membrana. Los cuerpos de los fitoplasmas contienen un enrejado fibrilar de hebras, que se supone son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas. Estos organismos aparentemente se propagan por fisión binaria, gemación o fragmentación. Los fitoplasmas son los procariotes más pequeños capaces de replicación autónoma. (Salazar. s.f.)²

La diferencia de las bacterias es sobre todo la pared celular y esto les lleva a asumir formas muy variadas; poseyendo, sin embargo, una membrana de naturaleza proteico-glucídica y lipídica. No poseen un verdadero núcleo aunque contengan más DNA que RNA. (Wikipedia, s.f.)²

2.3.2 Fitoplasmas en papa: Enfermedades y síntomas

En la papa se han reportado varias enfermedades producidas por fitoplasmas, tales como enrollamiento púrpura del ápice (PTR), flavescencia marginal (MF), escoba de brujas (WB), filodia de la papa (PP), marchites de la punta morada (PTW) y "stolbur". Las varias características comunes entre estas enfermedades relacionadas con un rango de huéspedes, síntomas en papa, tipo de vectores (especies de Familia. Cicadellidae) y eficiencia de transmisión; sugieren que son causadas por fitoplasmas relacionados. PTW origina brotes erectos y las hojas se enrollan hacia arriba con el progreso de la enfermedad. La pigmentación púrpura se produce en la base de los folíolos y los tallos se marchitan debido a necrosis del floema interno de los tallos. Las plantas jóvenes afectadas producen tubérculos aéreos y engrosamiento de los nudos del tallo. Los tubérculos producidos por las plantas infectadas pueden ser flácidos y producen brotes ahilados cuando se rompe la dormancia. (Salazar. s.f.)²

2.3.3 Vectores

Hasta ahora los vectores reconocidos de fitoplasmas son especies de insectos de las superfamilias Cicadelloidea y Fulgoroidea, aunque muy pocos han sido atribuidos a especies de Psylloidea (nota: varios taxónomos no han aceptado la elevación de la familia Cicadellidae a superfamilia). No más de 12 especies han sido implicadas en la transmisión de fitoplasmas en papa, aunque más de 130 han sido reconocidas como vectores de fitoplasmas. En papa, aparentemente hay todavía mucha confusión acerca de los vectores de fitoplasmas. Los fitoplasmas son organismos que en relación con su vector son considerados patógenos transmitidos en forma persistente, por lo tanto requieren de largos periodos de adquisición. Los periodos de adquisición hasta ahora conocidos en la transmisión de fitoplasmas son muy variables. La gran mayoría son transmitidos en periodos de adquisición de 2 a más de 30 días, aunque algunas variantes del amarillamiento del aster pueden ser transmitidos entre 8 y 24 horas, en todos los casos hasta ahora estudiados, los vectores de fitoplasmas requieren de un periodo de incubación (desde la adquisición hasta la transmisión), este varía dependiendo del fitoplasma, entre 10 y 35 días. Varios estudios han demostrado que los fitoplasmas son propagativos en su vector y pueden inducir cambios benéficos y detrimentales en ellos, alargando o acortando su periodo de vida. Estos organismos pueden persistir en su vector hasta 88 días en algunos casos. Durante este tiempo los insectos pueden transmitir al fitoplasma. (Salazar. s.f.)² (Ver anexo 5)

2.3.4 Interacción patógeno - vector

La relación entre el vector y el patógeno (Fitoplasma - insecto) indica que la forma de transmisión es semipersistente y que este puede adquirir al patógeno en un lapso mínimo de 15 minutos hasta horas y ser transmitido en un tiempo similar o mayor (30 min.). Las ninfas en los primeros tres estadios de desarrollo, son poco móviles y tiene poca movilidad dentro de la hoja o foliolo entre el cuarto y quinto estadio, tienen menor capacidad de movimiento que los adultos, por lo que tienen una mayor capacidad adquisición del patógeno al colonizar plantas infectadas; no obstante, lo contrario sucede si hospedan plantas libres del patógeno (Mejía et al. 1992).

2.4 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales, es decir mediante la acción de depredadores, parásitos y patógenos.

- Los parásitos de las plagas: Insectos que viven a expensas de otro denominado hospedero, al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval.
- depredadores: Son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas, en forma más o menos rápida succionándoles la sangre o devorándolos.
- Los patógenos: Son microorganismos: virus, rikettsias, bacterias, protozoarios, hongos y nematodos que causan enfermedades o epizootias entre las plagas. (Cisneros.1995).
- Entomopatógenos: son microorganismos que viven a expensas de insectos de diferentes órdenes en forma natural, no causan daño al hombre, animales ni plantas. (SENASA, s.f.)

2.5 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Son organismos heterótrofos (que no realizan fotosíntesis), que poseen células quitinizadas, normalmente no móviles. El inicio de la infección se realiza por germinación de las esporas del hongo sobre el tegumento del individuo plaga. La dispersión de las esporas se realiza a través del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto con otros sanos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro de hospedantes (insectos y ácaros). El hongo sale del insecto enfermo a través de las aperturas (boca, ano, orificios de unión de los tegumentos y artejos) y en el exterior forma

sus estructuras fructíferas y las esporas. Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento, que se corresponden con las esporas germinadas del hongo. Normalmente, los hongos entomopatógenos son de acción lenta. Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos. Pero estos organismos dependen generalmente de las condiciones ambientales de temperatura (25° C) y de elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. Generalmente tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima o al menos en que esta deje de alimentarse. Son adecuados para su aplicación por introducción, manipulación ambiental o aumento inoculativo, pero no para aumentos inundativos. Se suelen comercializar en preparados a base de esporas que deben estar en agua unas 24 horas antes de su aplicación; comercialmente destacan los siguientes hongos entomopatógenos como controladores biológicos de insectos:

- *Beauveria bassiana*: sobre Coleópteros.
- *Verticillium lecanii*: sobre áfidos, moscas blancas y tisanópteros.
- *Metarhizium anisopliae*: sobre Homópteros y Coleópteros en general.

Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de ectoparásitos, virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, y alrededor de 100 géneros; dentro de los mas importantes se mencionan: *Metarhizium spp*, *Beauveria spp*, *Aschersonia spp*, *Entomophthora spp*, *Zoophthora spp*, *Erynia spp*, *Eryniopsis spp*, *Akanthomyces spp*, *Fusarium spp*, *Hirsutella spp*, *Hymenostilbe spp*, *Paecilomyces spp* y *Verticillium spp*, pertenecientes a la clase Zygomycetes e Hyphomycetes. (Monografías, 2006.)

2.5.1 Características que favorecen a los Hongos Entomopatógenos

- Alto poder patogénico.
- Capacidad de multiplicación y dispersión en el ambiente a través de los individuos de la misma población.
- Se desarrollan a temperaturas entre 20 y 28 AC, pero no a 37 AC, por lo que se puede deducir que no son dañinos al hombre y animales de sangre caliente.
- Inocuidad para insectos benéficos.
- Crecen rápidamente en medios de cultivo, utilizados comúnmente en trabajos microbiológicos.
- Se pueden aplicar con equipos agrícolas convencionales.

(Parada y de Serrano, 1998).

2.5.2 Clasificación taxonómica de los Hongos Entomopatógenos

Según la clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973) citado por Carreño, (2003) los hongos entomopatógenos se separan en dos divisiones: Myxomycota (los que forman plasmodios) y Eumycota (los que no forman plasmodios y suelen ser miceliales).

Tanada and Kaya (1993) citados por Carreño, (2003), mencionan que los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina, los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los ordenes de insectos; la mayoría comúnmente son Hemíptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Himenóptera y Orthoptera. En algunos órdenes de insectos los estados inmaduros (ninfas o larvas) son más a menudo infectados que los maduros o estado adulto, en otros puede suceder lo contrario. Los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados por los hongos. La especificidad del hospedero varía considerablemente, algunos hongos infectan un amplio rango de hospederos y otros están restringidos a unos pocos o a una sola especie de insectos.

Fargues (1976); Ferron *et al.* (1972), citados por Carreño (2003), afirman que *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* infectan cerca de 100 especies diferentes de insectos en varios ordenes, pero aislamientos de estos dos hongos tienen un alto grado de especificidad.

2.5.3 Características de los hongos de la Subdivisión Deuteromycotina

Tanada and Kaya (1993), citados por Carreño (2003), afirman que los Deuteromycotina u hongos imperfectos son imperfectos porque la mayoría de los hongos carecen de fase sexual, o bien ésta no se conoce. Al tener reproducción asexual, son formadores de conidias. Estos hongos comprenden dos clases, Hyphomycetes y Coleomycetes. Muchos son patógenos altamente virulentos y han sido aplicados en el control de insectos plaga.

2.5.4 Características morfológicas de la Clase Hyphomycetes

La descripción hecha por Valiela (1979), citado por Carreño (2003); sugiere que en esta clase las conidias no se forman ni en acérvulos ni en picnidios, sino que se originan en conidióforos libres o directamente en las hifas somáticas.

2.5.5 Modo de acción de los hongos entomopatógenos (Ver anexo 6)

Según Roberts y Humber, (1984); Hajek y St Legar, (1994), citados por Vargas (s.f.), el proceso de desarrollo de una enfermedad producida por hongos se divide en 10 pasos:

- 1. Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto.** Para penetrar el integumento externo del hospedero, la conidia debe adherirse a la superficie cuticular. La interacción entre la conidia y la cutícula depende de las sustancias mucilaginosas que rodean la conidia, las enzimas y además de la conformación morfológica del integumento que favorece la germinación de la conidia. Las conidias pueden adherirse al azar de acuerdo a los pliegues intersegmentales o a la rugosidad de la superficie de la cutícula.
- 2. Germinación de la conidia en la cutícula del insecto.** La germinación ocurre dentro de un mínimo de 12 horas, siendo necesaria una humedad relativa alta (mayor al 90 %). Fisiológicamente la germinación de la conidia es el retorno de la actividad o metabolismo vegetativo. Morfológicamente es la emergencia de la célula vegetativa de una conidia, en forma de un tubo germinativo que crece sobre la superficie cuticular formándose un apresorio o penetrando directamente a la cutícula. La célula apresoria le permite adherirse a la superficie cuticular.
- 3. Penetración de la cutícula.** La penetración se produce por un sistema enzimático de lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora. Las enzimas tienen un efecto específico sobre cada uno de los componentes de la cutícula, así la epicutícula o capa más externa, formada por lípidos (ácidos grasos y parafina) es desintegrada por las lipasas, la quitinasa desintegra la quitina, sustancia que le confiere resistencia y dureza a la cutícula. Así mismo las proteínas presentes en la cutícula son desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo.
- 4. Crecimiento del hongo en el hemocele.** El hongo crece en el hemocele como cuerpos hifales levaduriformes o blastosporas, que se multiplican por germinación.
- 5. Producción de toxinas.** Las toxinas producidas por los hongos entomopatógenos son las responsables de la mortalidad del hospedero, el rápido crecimiento del hongo indica que la muerte del insecto ocurre por el crecimiento vegetativo (ruptura de áreas membranosas o esclerotizadas) produciéndose altos niveles de micosis, mientras que la muerte rápida (48 horas o menos) es atribuida a la

producción de toxinas, permitiendo que otros organismos oportunistas invadan el hemocele resultando en un crecimiento reducido del hongo dentro del hospedero.

- 6. Muerte del insecto.** Esta puede ser antecedida por cambios en el comportamiento del insecto, como contracciones y pérdida de coordinación.
- 7. Desarrollo de la fase micelial.** En esta fase aparecen pequeñas manchas mecanizadas en los sitios de infección, observándose en algunos casos una coloración rojiza en el insecto hospedero. Estos insectos sirven de reservorio para los hongos durante periodos de condiciones adversas.
- 8. Emergencia del micelio hacia el exterior.** En condiciones de baja o moderada humedad relativa, el hongo continúa en el insecto sin embargo, con alta humedad el hongo crece a través de la cutícula.
- 9. Producción de unidades infectivas.** El metabolismo del hongo se reduce, formándose las unidades infectivas o conidias.
- 10. Dispersión de las unidades infectivas.** Esto sucede por medio del agua o el viento.

2.5.6 Producción de Hongos Entomopatógenos

Según Monzón (2001), citado por Carreño (2003); la producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato.

2.5.7 Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc). El pH ha de ser 5 ó ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Además se deben añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras. Los más usados son el Cloranfenicol y la Gentamicina. Existen tres tipos de medios de cultivo para los hongos de acuerdo a su procedencia y origen de sus componentes: 1. Medios naturales: se caracterizan por estar preparados por compuestos de origen natural y su composición no es exacta, como

pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición, no son fácilmente reproducibles, ni de amplio uso. 2. Medios semisintéticos, están conformados por compuestos de origen natural y químico, estos medios de cultivo están preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de procedencia desconocida o variable. 3. Medios sintéticos, presentan composición química definida cuantitativa y conocida. La mayoría de las fórmulas de los medios de cultivo utilizados para hongos contienen peptona, algún carbohidrato y agar (Pelczar *et al.* 1997, citado por Carreño, 2003)

2.5.8 Formulaciones de Hongos Entomopatógenos

La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a que el hongo este más protegido al momento de la aplicación, así mismo, la facilita; evitando que se sedimente fácilmente y/o que forme grumos que tapen la boquillas. Todo esto se hace con el fin de lograr una buena homogeneidad y distribución de las partículas del hongo, para poder ser manipuladas y aplicadas adecuadamente. Hay dos tipos de formulaciones:

1. Seca o polvo mojable en la cual se utiliza un vehículo, el cual puede ser de origen mineral o vegetal, que ayuda a absorber la humedad de las conidias y mantiene la viabilidad por un tiempo considerable.

2. Líquida o emulsificable que utiliza un líquido solvente y un emulsificante. El líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidas las conidias en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación. Además este líquido debe evitar la absorción de agua por las conidias y mantener su viabilidad (Monzón 2001, citado por Carreño, 2003).

Vélez *et al.* (1997), citado por Carreño, (2003), afirma que la comercialización de insecticidas basados en hongos entomopatógenos, requiere un control de las propiedades biológicas, físicas y químicas. Para esto se realizan pruebas microbiológicas como concentración de esporas, germinación de esporas y prueba de pureza. Además de las pruebas físico-químicas de determinación de pH, porcentaje de humedad, humectabilidad, suspensibilidad y taponamiento de boquillas, que aseguren al usuario un producto con la máxima eficacia de control en el campo.

2.5.9 Reactivación de los Hongos Entomopatógenos

Es conocido el procedimiento para mantener la virulencia constante mediante inoculación del hongo a un insecto hospedero vivo y su posterior re-aislamiento una vez muerto el mismo. La frecuencia de estos pases por insectos está dada por las veces que la cepa puede ser multiplicada sin perder su virulencia recomendándose generalmente hacerla cada 3 ó 4 pases por medio nutriente natural o sintético. Otro método empleado para mantener cepas virulentas ha sido la incorporación de larvas de lepidópteros desecados y pulverizados a un medio nutriente comercial (Oficina Cubana de la Propiedad Industrial 1986; citado por Carreño, 2003).

2.6 *Cladosporium sp*

2.6.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Deuteromycota

Orden: Moniliales

Familia: Dematiaceae

Género: *Cladosporium*

Especie: *sp.*

(Bayer CropScience 2006).

2.6.2 Características

En relación al hongo *Cladosporium sp.*, el género pertenece a la familia-forma *Dematiáceas* (Orden forma *Moniliales*, Subdivisión *Deuteromicotinas*) que engloba a unas 40 especies, algunas de ellas fitopatógenas y la mayoría saprófitas sobre vegetación o sobre el suelo; algunas de sus especies son capaces de atacar celulosa, pectina y lignina. Este hongo se puede decir que es un género de distribución cosmopolita, siendo uno de los taxa más aislado y abundante en los recuentos aerobiológicos de todo el mundo. (CATIE. 2000).

Cladosporium sp es uno de los hongos entomopatógenos que infectan insectos plaga como mosca blanca lo cual ha sido beneficioso para el control biológico de dicho insecto, esto es valioso ya que dicho hongo presenta actividad entomopatógena lo que resulta importante para la investigación en el cultivo de la papa. (Tipismana. 2005)

Cladosporium en medio de cultivo forma colonias de color oliváceo y a veces grises o marrones; aterciopeladas, flocosas o pelosas; a veces presenta estromas. Sus conidióforos son macronematosos o semimacronematosos simples o poco ramificados, con una coloración marrón o verdosa, y de superficie lisa o ligeramente granulosa en algunas especies (Flores et al. 2000).

2.7 *Paecilomyces spp*

2.7.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
División: Myxomycota
Sub división: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Paecilomyces*
Especie: *farinosus*, *tenuipes*, *fumosoroseus*, *lilacinus*.
(Monografías, 2006).

2.7.2 Características

Paecilomyces spp. Posee diversas especies entomopatógenas, siendo las más frecuentes *P. farinosus*, *P. tenuipes* y *P. fumosoroseus*. Ha sido observado sobre Lepidópteros, Coleópteros y Orthópteros. (Monografías, 2006.) Presenta micelio tabicado, conidióforos verticilados, células conidiógenas o fialides subglobosas, con un cuello estrecho donde nacen las conidias ovoides a subglobosas, desarrollándose en sucesión basipétala. (SENASA. s.f.)

El género *Paecilomyces* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fialides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fialides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias; éstas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide. Se registran como mínimo cinco especies de *Paecilomyces* infectando ocho especies de insectos diferentes. Las infecciones causadas por *P. fumosoroseus* se reconocen por el color rosado pálido mientras que en *P. lilacinus* son de color violeta claro. (Bustillo 2001. Citado por Carreño. 2003.)

2.7.3 Plagas que controla

Este hongo es el enemigo natural de muchas plagas que pertenecen a los órdenes Hemiptera y Homóptera, dentro de los que se encuentran las moscas blancas *Trialeurodes* y *Bemisia*. También tiene efecto contra dípteros y lepidópteros (Obregón. s.f.).

2.7.4 Modo de acción

El hongo en contacto con el insecto entra en competencia con la microflora cuticular, produciendo un tubo germinativo que atraviesa el tegumento del insecto y se ramifica dentro de su cuerpo, secretando toxinas que provocan la muerte del hospedante. El insecto muerto queda momificado y bajo condiciones de humedad, se cubre posteriormente de una esporulación blanquecina o lila. (Obregón. s.f.)

2.8 *Beauveria bassiana*

2.8.1 Clasificación taxonómica

Súper Reino:	Eucariota
Reino:	Myceteae
División:	Amastigomycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Hyphomycetes
Género:	<i>Beauveria</i>
Especie:	<i>bassiana</i>

(Castillo. 2001).

2.8.2 Características

Beauveria bassiana es parásito facultativo, cuyas conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado a morir por el hongo se cumple en tres fases: La primera fase de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia lo invade directamente, penetrando la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa. La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo. Esta relación se debe a factores muy concretos incluidos las diferencias cuticulares, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos pero para que se desarrollen siempre deben estar afuera del agregado. La segunda fase es la invasión de los tejidos por parte

del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos. El *Beauveria bassiana* produce metabolitos secundarios, como son: Beauvericin, Beauveriloides, Bassianolide, Isarolide, Enniatinas y Oosporeina. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, pérdida de coordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de las conidias en el tegumento. Finalmente sigue la tercera fase, la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico. (Castillo. 2001).

2.9 *Beauveria brongniartii*

2.9.1 Clasificación taxonómica

Súper Reino:	Eucariota
Reino:	Myceteae
División:	Amastigomycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Hyphomycetes
Género:	<i>Beauveria</i>
Especie:	<i>brongniartii</i>

(Castillo. 2001).

2.9.2 Características

Brongniart, en 1891, colectó un hongo que parasitaba langostas migratorias, lo describió y no le puso nombre. Saccardo, en 1892, lo nombro *Botrytis brongniartii* y Petch, en 1926, lo transfirió al género *Beauveria*. Este hongo se ha venido trabajando en el control del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp*), (Commonwealth Mycological Institute, 1979, citado por Torres et. al 1993).

El hongo *Beauveria*, es uno de los patógenos más importantes que afectan insectos, ha sido recuperado de muchos insectos del orden Coleóptera, Lepidóptera y Homóptera y probablemente ataca a todos los artrópodos. De acuerdo a la literatura existen dos especies: *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*. Es un hongo que crece de forma natural, se localiza en el suelo, aunque se puede reproducir o cultivar en el laboratorio ya que es

un hongo saprófito facultativo. Pertenece al orden Deuteromiceto, la reproducción es asexual por conidios, presenta un micelio de color blanco cremoso producto a las esporas. Las larvas infectadas se tornan de color blanco o gris. *Beauveria* es utilizado como bioinsecticida en algunos países. Tiene una lista extensa de hospederos que incluye a moscas blancas, áfidos, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, chinches, hormigas y mariposas. Incluso se ha encontrado infectando los pulmones de roedores silvestres y en los orificios nasales del ser humano. Estudios realizados demuestran que este patógeno se encuentra en la naturaleza siguiendo dos posibles ciclos de desarrollo, saprofíticos en desechos vegetativos y parasíticos en insectos. El crecimiento saprofítico puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo micelial. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de bajo costo para la producción masal. La infección parasítica de los insectos es causado por las esporas y la ruta más común de penetración directa se realiza a través de la cutícula del insecto. Estos hongos son muy específicos, al grado de género y/o especie, por lo que no infectan a plantas y animales. El desarrollo de estos patógenos es favorecido por condiciones de humedad. El hongo *Beauveria* tiene un potencial epizoótico considerable: puede dispersarse rápidamente a través de una población y puede hacer que colapse en pocas semanas. Debido a que penetra el cuerpo de su huésped, puede infectar a insectos chupadores como áfidos y moscas blancas, los cuales, no son susceptibles al ataque de bacterias y virus. Rango de hospederos: La mayoría de insectos plagas son susceptibles a los hongos entomopatógenos. Algunos hongos, como *Entomophthora* y especies relacionadas, son específicos a un grupo de insectos; pero *Beauveria* tiene un rango más amplio de hospederos. (Arrastía, 2004)

2.10 *Metarhizium anisopliae*

2.10.1 Clasificación taxonómica

Súper Reino:	Eucariota
Reino:	Myceteae
División:	Amastigomycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Deuteromycetes
Subclase:	Hiphomycetidae
Orden:	Moniliales
Género:	Metarhizium
Especie:	<i>anisopliae</i>

(Castillo. 2001).

2.10.2 Características

Presenta micelio septado, conidióforos característicos sobre los cuales surgen los conidios en columnas compactas, los conidios son generalmente unicelulares y cilíndricos de dimensiones variadas. Se caracteriza por tener fialides cilíndricas, sosteniendo cadenas de conidios cilíndricos que se adhieren lateralmente formando columnas conidiales. Se diferencia de *Metarhizium flavoridae* debido a que posee fialides clavadas sosteniendo cadenas de conidios ovoides o elipsoidales que se adhieren típicamente en masas paralelas, las dimensiones de los conidios se caracterizan por tener de 5 a 7.5 micras de largo y 2.3 a 3.7 micras de ancho. Existe variación en la dimensión de los conidios de 2 a 10.6 micras de largo y 3.5 a 8 micras de ancho. En la actualidad la especie *Metarhizium anisopliae* se utiliza en el manejo de las poblaciones de chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*) en la industria cañera mundial que afronta este problema. Este hongo causa enfermedades en más de 300 especies de insectos ubicado en siete órdenes y es el más difundido geográficamente. El hongo está clasificado dentro del grupo de Phialosporaceae muy próximo al género *Penicillium*. Las esporas son alargadas y se forman en cadenas organizadas en fialides, la conidia más joven es la de la base del conidióforo, presentan una pigmentación verde y su tamaño permite diferenciar las especies. (Castillo. 2001).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Insectos de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en sus tres estadios de huevo, ninfa y adulto en un total de 180 insectos adultos, 150 ninfas y 150 huevos, para los bioensayos preliminares. Insectos adultos de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* para la fase Experimental, en un total de 100 insectos.

3.1.1 Hongos entomopatógenos (HEP)

- ***Cladosporium sp.***: este hongo fue encontrado durante la realización del estudio “Síntomas asociados a cuatro niveles de infestación de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en *Solanum tuberosum*.” por Miguel Estrada e Iván Rico (2007), se observaron insectos adultos de *Bactericera cockerelli* parasitados por un hongo en un cultivo de tomate², el cual fue encontrado por Miguel Estrada, e identificado posteriormente como *Cladosporium sp.* por la Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de

² Estrada, MWJ. 2007. Evaluación de *Bactericera* (entrevista). San Salvador, ES, Universidad de El Salvador.

Serrano, Jefa del Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA)³.

- ***Metarhizium anisopliae***: Este material procede de un producto comercial, Fitosan – M, cepa aislada de “gallina ciega” en Guanajuato, México, introducida a El Salvador por el Dr. Mario Parada Jaco, el año 1999.
- ***Beauveria brongniartii***: Hongo procedente de San Martín Oztoloapan, Valle del Bravo, Edo. de México. Encontrado de forma silvestre atacando a *Phillophaga vetula* en 1999; Introducido al país ese mismo año por el Dr. Mario Ernesto Parada Jaco. A partir del año 2000 se iniciaron investigaciones en CENTA utilizando este material en el control de:
 - ✓ *Zabrotes subfaciatus*.
 - ✓ *Acanthocelides obtectus*.
 - ✓ *Atta sp.*
 - ✓ *Ácaros*.
 - ✓ *Anthonomus eugenii*.
- ***Beauveria bassiana***: Aislamiento derivado de un producto comercial elaborado y distribuido en El Salvador por la Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café PROCAFE como *Beauveria bassiana* para el control de la broca del fruto. Este producto se obtuvo a través del Dr. Adán Hernández de PROCAFE, en el año 2008.
- ***Paecilomyces sp.***: Hongo procedente del Valle de Zapotitán, Departamento de La Libertad, encontrado de forma silvestre, infectando mosca blanca a partir del cual se iniciaron investigaciones sobre el control de mosca blanca utilizando esta hongo en el año 2003 por Martínez Barahona, en el cultivo de pepino. (Martínez, 2003)
- **BAZAM, METAZAM, PAZAM**: Productos comerciales elaborados a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* respectivamente. Estos productos se obtuvieron a través de una solicitud al Ing. Orlando Cáceres representante de PROMIPAC El Salvador. Estos productos son

³ Guzmán de Serrano, RF. 2007. Reconocimiento del hongo como *Cladosporium Sp.* (entrevista). La Libertad, El Salvador, Laboratorio de Parasitología Vegetal (CENTA).

elaborados en la Escuela Agrícola Panamericana ZAMORANO de la Republica de Honduras.

3.2 UBICACIÓN

3.2.1 Bioensayos preliminares

Ubicados en la agencia de Extensión Agropecuaria del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA Las Pilas, Municipio de San Ignacio, Departamento de Chalatenango, con un duplicado en el Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA en San Andrés, La Libertad.

3.2.2 Ensayo estadístico

Ubicado en el Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) ubicado en Km. 33 ½, carretera a Santa Ana, Ciudad Arce, La Libertad, El Salvador.

3.3 DURACIÓN

El estudio se realizó en el período de Enero a Septiembre de 2008, y su objetivo fue determinar en condiciones de laboratorio cual de los hongos evaluados presenta mayor potencial como controlador biológico de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en plantas de papa, con el propósito de obtener un ente biológico capaz de ejercer un control biológico efectivo sobre el insecto en sus diferentes estadios, huevo ninfa y adulto. El estudio comprendió tres fases:

- a) Fase de campo (muestreo de parcelas, recolección de insectos, bioensayos).
- b) Fase experimental y toma de datos (en condiciones de laboratorio).
- c) Fase de análisis de resultados y procesamiento de la información.

3.4 FASE DE CAMPO (RECOLECCIÓN DE INSECTOS, BIOENSAYOS)

3.4.1 Muestreo de parcelas

Esta actividad consistió en ingresar a diversas parcelas de productores de papa, de la zona de Las Pilas, revisando plantas y buscando alguna sintomatología característica de la enfermedad "Punta Morada" que la literatura menciona; daños como amarillamiento foliar, producción de tubérculos aéreos, tallo de color púrpura y enrollamiento de hojas.

(Fig. 17)

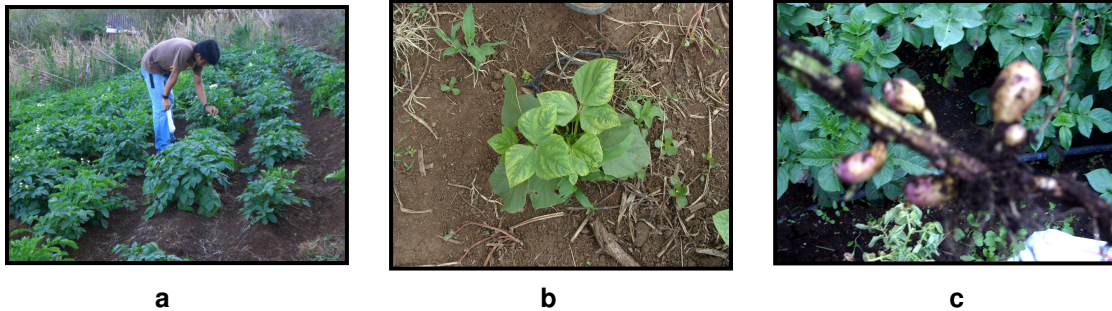


Fig. 17. Muestreo en parcelas: a) Observación de follaje de plantas de papa; b) Planta de papa con follaje amarillento por la enfermedad; c) Tubérculos aéreos en papa.

3.4.2 Densidad de población de la plaga *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*

Como primera actividad se observaron las plantas de papa cuidadosamente para verificar si existía la presencia del insecto plaga, logrando localizar los diferentes estadios del insecto; en el caso de los adultos en el haz de las hojas, en el envés de las hojas las ninfas y huevos en las nervaduras y orillas de las hojas.

Para tener un parámetro de los índices poblacionales de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en las parcelas de papa se efectuaron muestreos, para lo cual se utilizó red entomológica; con la que se realizaron treinta pasos de red dentro de las parcelas en forma de Zig – Zag. Esta actividad se desarrolló en los meses de Febrero a Abril donde no se presentan lluvias, ya que de lo contrario no podría haberse efectuado la actividad. (Fig. 18)



Fig. 18. Muestreo de poblacional de insectos.

3.5 BIOENSAYOS PRELIMINARES

En el transcurso de la investigación se planificaron dos bioensayos previos a la fase Experimental, con el objetivo de identificar los hongos con mayor potencial como

biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*; para esta fase se evaluaron cuatro géneros y cinco especies de hongos entomopatógenos.

3.5.1 Primer bioensayo

Para efectuar esta prueba se elaboro un protocolo con cada uno de los pasos previos para el montaje de este; dichos pasos se describes a continuación: (Ver anexo 7)

Se inicio con la selección de los hongos, los cuales fueron *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces sp* y *Beauveria brongniartii*. Posteriormente se realizo una búsqueda y recolección de insectos en parcelas de los productores de papa, tomate y chile de Las Pilas, utilizando un aspirador entomológico y jaula de transporte, hechos de forma artesanal (Fig. 19).



Fig. 19 Equipo de recolección de insectos: a) Jaula de transporte, b) Aspirador

El procedimiento para recolectar los insectos consistió en aspirarlos y depositarlos en la jaula de transporte que contenía material vegetal para que los insectos se alimentaran y se mantuvieran vivos; en esta actividad se colectaron entre 100 y 150 insectos adultos. (Fig. 20).



Fig. 20. Recolección de insectos: a) Recolección en chile dulce, b) Alojamiento de insectos en jaula.

Terminada la actividad de recolección de insectos, se realizó el montaje de este bioensayo preliminar en la Agencia de Extensión Agropecuaria de CENTA Las Pilas. Se prepararon cinco unidades experimentales en cajas Petri con sus duplicados, haciendo un total de diez debidamente rotuladas, con el nombre del hongo, la fecha y el lugar, dejando cinco en la Agencia de Extensión de CENTA de Las Pilas y las otras cinco se trasladaron al Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA, en San Andrés, La Libertad, con el objetivo de observar el comportamiento de los hongos entomopatógenos en condiciones ambientales distintas, pues las unidades experimentales que se encontraban en la Agencia del CENTA Las Pilas estuvieron a temperaturas de 17°C máximo y 9°C como mínimo y a una elevación de 1960 msnm, mientras que las que se llevaron al laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA en San Andrés, estaban a temperaturas de 28°C máximo y 25°C como mínimo y una elevación de 460 msnm.

Identificadas las cajas Petri, se colocó papel filtro en cada una de ellas, se humedeció con 30 gotas de una solución preparada, a base de una gota de dispersante de esporas (Tween), 25 ml de agua destilada estéril y 1 g de hongo respectivo para cada suspensión; para el testigo únicamente se utilizó agua destilada estéril. (Fig. 21)



a



b



c



d

Fig.21. a) Preparación de suspensión con el entomopatógeno, b) Aplicación de dispersante de esporas (Tween) a la suspensión, c) Suspensiones preparadas, d) Aplicación de suspensión.

Aplicada la suspensión se introdujeron 6 insectos de *Bactericera* sobre papel filtro de cada caja Petri con ayuda de un succionador entomológico utilizando 60 insectos para el montaje (Fig. 22); es importante mencionar la aplicación de las tres suspensiones de hongos a dos de las unidades experimentales preparadas; conformando una aplicación mixta. Finalmente, las diez cajas Petri fueron debidamente selladas con parafilm. (Fig. 23)



Fig. 22. Introducción de insectos en caja Petri



Fig. 23. Sellado de cajas Petri con parafilm.

3.5.2 Segundo Bioensayo

El procedimiento para este bioensayo fue igual que el primero, con la diferencia que se utilizaron otros hongos, productos comerciales de ZAMORANO *Beauveria bassiana* (BAZAM), *Metarhizium anisopliae* (METAZAM), *Paecilomyces lilacinus* (PAZAM), *Beauveria bassiana* de PROCAFE y *Cladosporium sp*, hongo nativo de Las Pilas.

Por otra parte se elaboró una cámara de inoculación artesanal (Fig. 24) utilizando una caja de cartón, con el objetivo de tener menos contaminación en las preparaciones de las suspensiones y cajas Petri.



a



b

Fig.24. a) Manipulación de HEP dentro de una cámara de inoculación artesanal, b) Unidades inoculadas dentro de la cámara de inoculación artesanal.

3.6 FASE DE LABORATORIO

3.6.1 Observación de material experimental

Esta fase consistió en hacer lecturas de las cinco cajas Petri de cada uno de los bioensayos anteriormente descritos, dichas lecturas se realizaron 8 días después del montaje del bioensayo en el Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA y 12 días después para las que fueron preparadas en la Agencia de Extensión Agropecuaria de CENTA de Las Pilas; con el fin de observar si los insectos habían sido invadidos por el hongo, para esto se utilizó microscopio estereoscópico y compuesto.

3.6.2 Observación de muestras en microscopio estereoscópico

Se observaron los seis insectos de los bioensayos mencionados en la fase anterior dentro de la caja Petri, para determinar cuantos de ellos habían sido invadidos por el hongo aplicado en cada una de las cajas y si los insectos estaban vivos o muertos; observando características como el color del crecimiento micelial, que es característico de los hongos utilizados en estos bioensayos. Además se observó si existía la presencia de hongos y bacterias contaminantes (Fig. 25).

3.6.3 Observación de muestras en microscopio compuesto

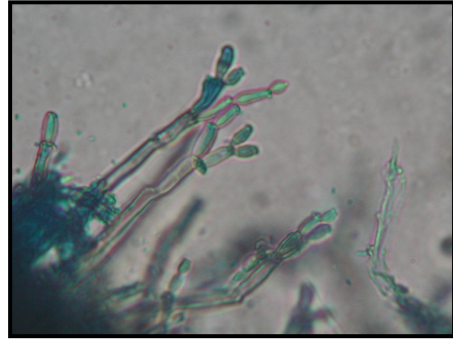
Se tomaron muestras del micelio presente en el insecto, colocándolo en una laminilla portaobjetos, sobre una gota de agua o lactofenol azul algodón, luego cubriéndolo con una laminilla cubreobjeto, y observándolo en el microscopio compuesto en objetivos 4X, 10X, 40X; para observar y reconocer las estructuras características de las especies de hongos entomopatógenos utilizados. (Fig.26) Con el objetivo de corroborar si el hongo mato al insecto y descartar contaminantes.



Fig. 25. Observación de muestras de bioensayos en microscopio estereoscópico.



a

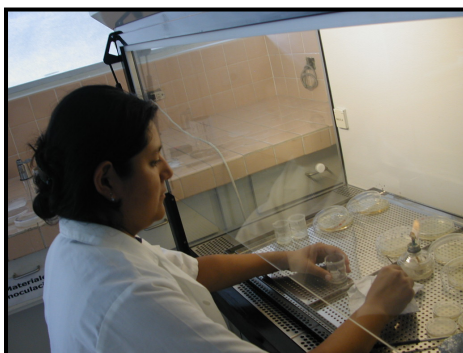


b

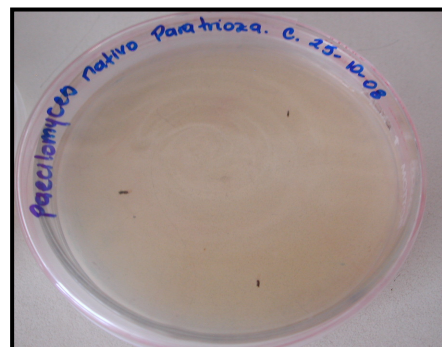
Fig. 26. a) Observación de muestras en microscopio compuesto, b) conidio de *Beauveria brongniartii*.

3.6.4 Aislamiento de insectos

Una vez identificada la presencia de las estructuras (micelio y conidia) de los hongos aplicados en el insecto se procedió al aislamiento de los hongos entomopatógenos. Se utilizó una cámara de flujo laminar para evitar contaminación de otros organismos; se colocaron tres insectos por caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en cada una de ellas, para corroborar si el insecto había muerto por el hongo, esto con la finalidad de verificar si el hongo aplicado había sido el causante de la muerte del insecto que previamente había sido desinfectado mediante un triple lavado, sumergiendo el insecto durante 30 segundos en cada una de las soluciones utilizadas, alcohol, lejía y agua destilada, cabe mencionar que al medio de cultivo se le aplicó estreptomycin para evitar el crecimiento bacterial. (Fig.27)



a



b

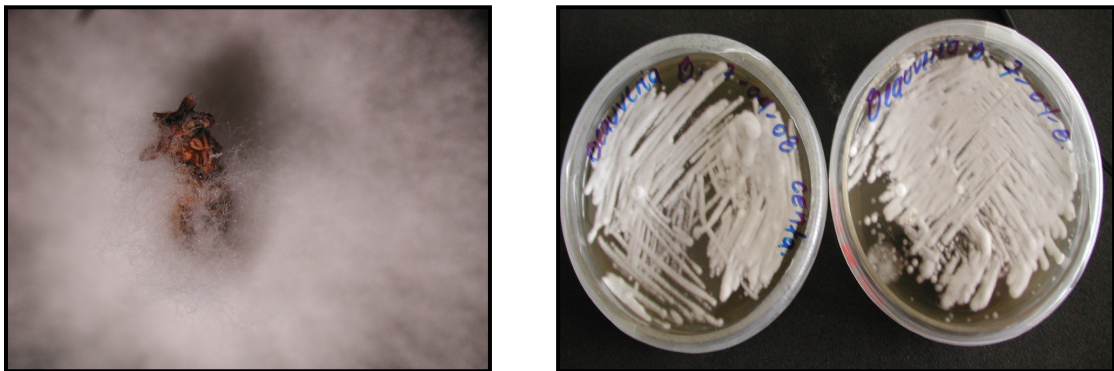
Fig. 27. a) Aislamiento de insectos en cámara de flujo laminar, b) insectos aislados en medio PDA.

3.7 FASE EXPERIMENTAL EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Una vez evaluados los materiales experimentales, descritos en los bioensayos, se definió que los hongos *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana* (BAZAM) y *Metarhizium anisopliae* (METAZAM), presentaron mejores características como biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*. Antes de iniciar el ensayo con diseño estadístico, se realizaron tres pruebas de requerimiento de calidad para cada uno de los entomopatógenos; dichas pruebas consistían en:

3.7.1 Pruebas de requerimiento de calidad

a) Pureza: Se aislaron los hongos utilizados en los bioensayos preliminares en estudio, tomando el insecto infectado y sumergiéndolo por 30 segundos en soluciones de alcohol, lejía y agua destilada estéril, con el fin de eliminar todo agente contaminante externo del insecto. Se colocaron tres insectos infectados con cada uno de los hongos en estudio por cada caja Petri en medio de cultivo PDA, para observar el crecimiento del hongo inoculado con el fin de obtener un cultivo puro (Fig. 28), ya que de esta forma el hongo presentaría mayor agresividad sobre el insecto durante el ensayo.



a

b

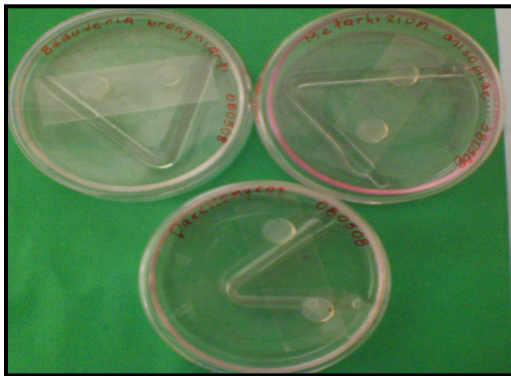
Fig. 28. a) *Bactericera cockerelli* infectada por *Beauveria brongniartii*, b) *Beauveria brongniartii* aislado en cultivo puro.

b) Viabilidad o germinación: El objetivo de esta prueba fue determinar el tiempo de germinación de las esporas de los hongos en estudio (Fig.29), ya que se requiere que la germinación de las esporas sea mayor o igual al 85% en menos de 24 horas., debido a que las aplicaciones en campo requieren condiciones ambientales diferentes a las

aplicaciones en laboratorio. En el campo la espora muere si no tiene un medio para alojarse y la luz ultra violeta mata la espora.⁴

La prueba consistió en cortar círculos de medio de cultivo PDA y colocarlos en cajas Petri, sobre un porta objeto en los cuales se depositaron alícuotas que contenían las esporas y este a su vez, sobre un tubo de vidrio para evitar el contacto directo con el agua estéril colocada en la caja Petri. De la dilución de 1:1000 de cada submuestra preparada en dicha prueba se tomo una gota para depositarla en el círculo de PDA, se encubaron a temperatura ambiente (26-28AC) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo se realizo el conteo de esporas germinadas, tomando como parámetro que el crecimiento del tubo germinativo debe de ser el doble del tamaño de la espora, contando también las esporas no germinadas, con estos datos se obtienen los porcentajes de germinación.

- *Metarhizium anisopliae* 96% de esporas germinadas.
- *Beauveria brongniartii* 98% de esporas germinadas.
- *Beauveria Bassiana* 96% de esporas germinadas.



a



b

Fig. 29. Prueba de germinación de esporas: a) cajas Petri conteniendo círculos de PDA sobre una laminilla porta objeto con cada uno de los tres hongos puestos a germinar; b) germinación de esporas de *Metarhizium anisopliae* (METAZAM).

⁴ Parada Jaco M.E., 2008. Pruebas de calidad para hongos entomopatógenos (entrevista). La Libertad, El Salvador, Departamento de Granos Básicos (CENTA).

c) Concentración: Esta prueba se refiere a la cantidad de conidias por cada mililitro de agua (conidias/ml), debido a que se requiere una cantidad de conidias determinada para que el hongo tenga efecto sobre el insecto, la cual, corresponde a la de 10^8 conidias/ml. Para obtener esta concentración se hicieron diluciones de 1g de hongo en 9 ml de agua destilada estéril mas una gota de dispersante de esporas (Tween), obteniendo la primer dilución de 1:10; de esta dilución se tomo 1ml y se coloco en 9 ml de agua destilada estéril nuevamente para obtener la segunda dilución 1:100 y por ultimo siguiendo esa misma metodología se obtuvo la dilución 1:1000 la cual se utilizo para realizar el conteo de esporas en cámara de Neubauer (Fig.30).

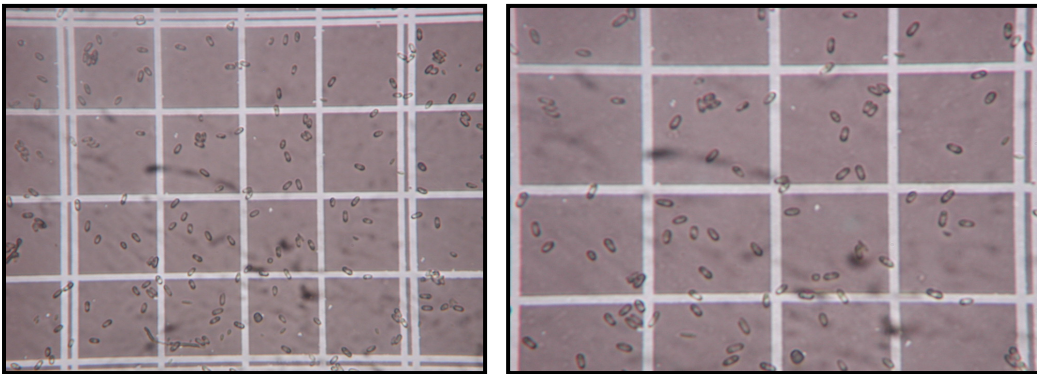


Fig.30. Conteo de esporas de *Metarhizium anisopliae* (METAZAM) en cámara de Neubauer para la prueba de concentración de conidias/ml.

3.7.2 Reproducción de hongos en arroz

Con la finalidad de obtener una cantidad considerable de esporas de los hongos entomopatógenos se hicieron repiques utilizando como medio arroz para su reproducción. (Fig. 31)



Fig. 31. Procedimiento para la reproducción de los Hongos Entomopatógenos en arroz: a) Lavado del arroz, b) Aplicación de antibiótico (Tetraciclina) para evitar crecimiento bacterial, c) Secado al sol hasta reducir adecuadamente la humedad, d) Prueba de humedad del arroz al tacto, e) Llenado de botes a inocular con el hongo, f) Esterilización del arroz en autoclave a 120AC de temperatura y 15 bares de presión durante 30 minutos, g) Inoculación del arroz con el hongo *Beauveria brongniartii*, h) Producción y conservación del hongo.

3.7.3 Obtención de esporas:

El arroz inoculado con el hongo, se colocó en incubadora a 4AC por un periodo de dos semanas y media para que el hongo se desarrolle en el sustrato, transcurrido este periodo el arroz colonizado por el hongo se colocó en un azafate con papel de empaque, para que este absorba la humedad del arroz, para agilizar este proceso se colocó en estufa a 40AC, hasta disminuir la humedad, de lo contrario se deja a temperatura ambiente. El arroz libre de humedad pasó por un tamiz # 16, para separar las esporas del grano de arroz, para lo cual, se colocó en ambos extremos del tamiz bolsas plásticas para que las conidias se mantuvieran dentro del lugar de recolección evitando pérdidas de las mismas sin tener contacto directo de las esporas con las manos. (Fig. 32)



Fig. 32. Obtención de esporas de *Beauveria brongniartii*: a) Arroz inoculado, b) Tamizado del arroz, c) Obtención de esporas.

3.7.4 Preparación de suspensiones acuosas de hongos entomopatógenos para evaluar la inefectividad

Para obtener la suspensión lista para la aplicación se realizaron diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, llegando a utilizar la concentración de 1:1000 para aplicar a los insectos en prueba. El procedimiento fue el siguiente: se aplicó 0.77 g de *Beauveria brongniartii*, 1.0 g de *Metarhizium anisopliae* (METAZAM) y 1.0 g de *Beauveria bassiana* (BAZAM) en 9 ml de agua destilada, se agregó una gota de dispersante de esporas (Tween) y se pasó por un agitador VORTEX. (Fig. 33)

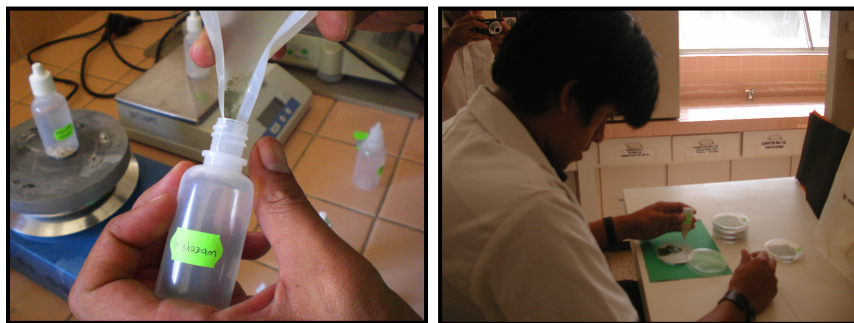


Fig. 33. a) Preparación de la suspensión de los HEP; b) Aplicación de la suspensión de HEP.

Cada caja Petri contenía 5 insectos (unidades experimentales), 25 insectos por tratamiento y 100 en el total del ensayo. Se colocaron 30 gotas (1ml) de suspensión del hongo descrita anteriormente, para humedecer el papel filtro de una caja Petri, en total se usó 5ml por tratamiento. El material vegetal se lavó con agua destilada para eliminar los microorganismos contaminantes, se secó e introdujo en las cajas; esto como reserva alimenticia para los insectos mientras se observa el efecto de los hongos sobre ellos.

3.8 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.8.1 Factor en estudio

Control biológico de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* con hongos entomopatógenos en plantas de papa.

3.8.2 Unidad experimental

Insectos adultos de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en cajas Petri, teniendo un total de 20 unidades experimentales en las cuales cada una de ellas esta constituida por cinco insectos (Fig. 34).

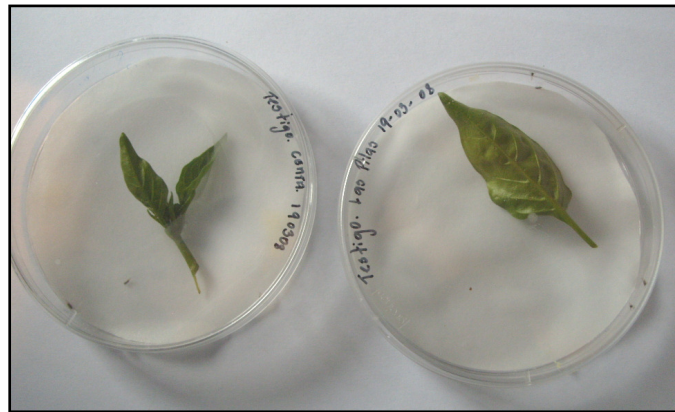


Fig.34. Unidad experimental: insectos adultos de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en cajas Petri.

3.8.3 Diseño estadístico

Se utilizó un diseño estadístico irrestricto al azar (DIA) o diseño completamente al azar; el cual es útil para comparar muchos tratamientos. Para tomar decisiones sobre el comportamiento de tres o más tratamientos, la técnica utilizada fue la de análisis de varianza (ANVA); que es una base fundamental para diseños de este tipo de investigación; ya que el diseño esta compuesto por cuatro tratamientos y cinco repeticiones.

3.8.4 Descripción de los tratamientos: (Fig. 35)

T1= *Beauveria bassiana* (BAZAM) 10^8 conidias/ml.

T2= *Beauveria brongniartii* 10^8 conidias/ml.

T3= *Metarhizium anisopliae* (METAZAM) 10^8 conidias/ml.

T4= Testigo (agua destilada estéril).

- Modelo estadístico: Respuesta = Contraste + Efecto tratamiento + Error

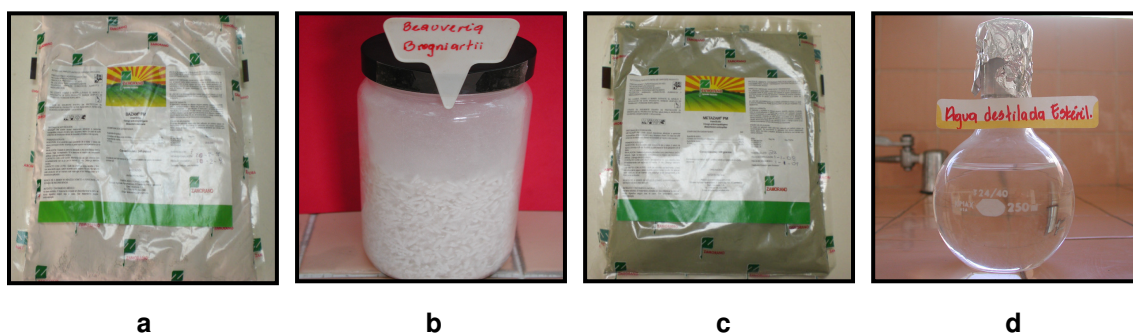


Fig. 35. Tratamientos utilizados en el diseño: a) *Beauveria bassiana* (BAZAM); b) *Beauveria brongniartii*; c) *Metarhizium anisopliae* (METAZAM; d) Testigo (agua destilada estéril).

3.8.5 Distribución estadística

La distribución estadística del experimento con hongos entomopatógenos para el control de insectos adultos de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* se detalla en el cuadro 1.

Cuadro 1. Distribución estadística utilizada en el experimento.

Fuentes de variación	G. L.	S.C.	C. M.	F Calculado
Tratamiento	4	$1/n y_i - y_{..}^2/na$	SC trat/a-1	C.M. trat/C.M.E.
Repetición	3			
Error experiment	12	SC total- SC tra	SC error exp/a(n-1)	
total	20-1 = 19			

y_i = Representa el total para el tratamiento

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

G.L = Grados de libertad

S.C = Suma de cuadrados

C.M = Cuadrado medio

C.M.E = Cuadrado medio de error experimental

3.8.6 Coeficiente de variabilidad

Este se calcula como la razón entre la desviación estándar y la media; expresándose en porcentaje (cuadro 2). Es muy importante ya que permite tener una idea de la precisión relativa en el experimento. La fórmula para su cálculo es la siguiente.

$$C.V = S / \bar{X} * 100$$

Cuadro 2. Significancia del coeficiente de variabilidad.

Valor del coeficiente de Variabilidad (%)	Significancia
0 — ≤ 10	Altamente significativo
10 — ≤ 20	Bastante significativo
20 — ≤ 30	Poco significativo
30 — ≤ 40	Dudosa significancia
40 — ≥	No existe ninguna significancia

3.8.7 Distribución al azar de tratamientos

Para instalar el ensayo en el laboratorio se utilizaron 20 cajas Petri esterilizadas conteniendo en su interior papel filtro; 15 de ellas humedecidas con una solución compuesta por 20 ml de agua destilada mas el hongo entomopatógeno calibrado y pesado mas una gota de dispersante o tween, y las cinco restantes correspondiendo a testigos, utilizando únicamente agua destilada. (Fig. 36) La distribución de los tratamientos fue de la siguiente forma (cuadro 3):

Cuadro 3. Tratamientos del ensayo ubicados de forma azarizada

Azarización de tratamientos.				
T4 R5	T3 R4	T2 R4	T3 R3	T4 R4
T2 R5	T4 R3	T1 R5	T1 R4	T4 R2
T2 R2	T2 R3	T3 R5	T1 R1	T1 R2
T3 R1	T1 R3	T2 R1	T3 R2	T4 R1

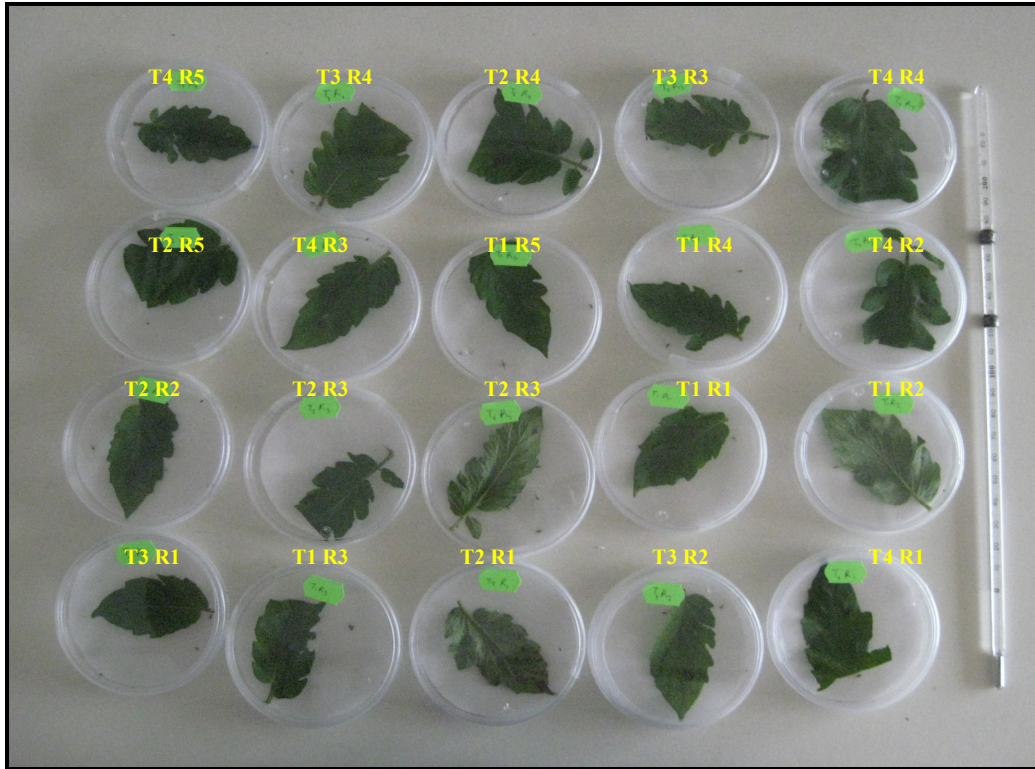


Fig.36. Instalación del ensayo experimental.

3.8.8 Hipótesis científica

Al hacer la aplicación de los hongos, *Beauveria bassiana*, *Beauveria Brongniartii* y *Metarhizium anisopliae* bajo condiciones de laboratorio, al menos uno funciona como controlador de *Bactericera cockerelli* en papa.

3.8.9 Hipótesis estadística

Las hipótesis estadísticas planteadas en la investigación fueron las siguientes.

H_1 : Al evaluar los hongos entomopatógenos sobre *Bactericera cockerelli*, controlaran de diferente manera los insectos plaga.

H_0 : Al evaluar los hongos entomopatógenos sobre *Bactericera cockerelli*, controlaran de la misma manera los insectos plaga.

3.8.10 Variables evaluadas

- Mortalidad aparente del insecto.
- Mortalidad real del insecto.
- Diámetro de colonia del hongo.

3.9 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos fueron ordenados y procesados a través del programa estadístico MSTATC versión 1.0 (1988) de los Drs. Héctor Barreto y William Raun del CIMMYT, México D.F, mediante la colaboración de la Unidad de Biometría y Socioeconomía del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), a través del Ing. Agr. Marcos Mejía.

3.9.1 Toma de datos

Para la toma de datos se realizaron lecturas diarias de temperatura por la mañana y por la tarde, con el objetivo de llevar un registro de las condiciones ambientales en las que se encontraba el ensayo estadístico. Por otra parte las lecturas de las variables en estudio se realizaron seguidamente de las lecturas de temperatura entre las 8:00 y 11:00 de la mañana. (Fig. 37)



Fig. 37. Lecturas de temperatura y observación de tratamientos.

3.9.2 Lecturas de mortalidad aparente del insecto

Se entiende por mortalidad aparente aquella muerte del insecto que probablemente estuvo influenciada por el hongo, sin confirmar aun la acción del hongo sobre el insecto, atribuyendo la muerte de los insectos también a otros factores ambientales como la temperatura y la elevada humedad relativa dentro de las cajas Petri.

Estas lecturas se realizaron con apoyo de microscopio estereoscopio, en orden cronológico entre los tratamientos y las repeticiones de cada uno de ellos, en donde se hacían observaciones de insectos muertos y si la muerte de estos se le atribuía a los entomopatógenos al observar crecimiento de micelio sobre los insectos, realizando dos lecturas una a los cinco y otra a los diez días. (Fig. 38)



a



b

Fig. 38. Lecturas de mortalidad aparente de los tratamientos: a) lecturas a simple vista; b) lecturas en microscopio estereoscópico.

3.9.3 Lecturas de mortalidad real

Se entiende por mortalidad, real aquella en donde se ha demostrado que los hongos evaluados fueron los causantes de la muerte de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* mediante una desinfección externa y aislamientos en medio de cultivo PDA de los insectos muertos. Para esta variable se realizaron dos lecturas, una a los cuatro y otra a los ocho días, se utilizó el apoyo de microscopio estereoscópico y microscopio compuesto, para hacer observaciones de crecimiento de micelio de los hongos en estudio sobre el insecto colocado en medio de cultivo PDA, esto con el fin de confirmar que el hongo fue el causante de la muerte del insecto. (Fig. 39)



Fig. 39. Lecturas de mortalidad real, tratamientos observados en microscopios estereoscópico y compuesto.

3.9.4 Lecturas de crecimiento de colonia del hongo

Se realizaron tres lecturas de esta variable realizadas a los tres, cinco y siete días; donde se observó y midió el crecimiento de la colonia del hongo en el medio de cultivo, para esto se utilizó microscopio estereoscópico con ayuda de una regla graduada en centímetros. (Fig. 40)

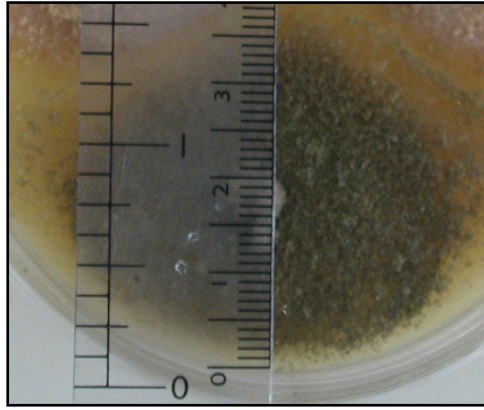


Fig. 40. Crecimientos de colonias *Metarhizium anisopliae* de observado a simple vista.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 CONDICIONES CLIMATICAS DE LOS LUGARES DE ESTUDIO:

Tanto para la zona de Las Pilas como en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), se registraron promedios de temperatura y humedad relativa variables durante el tiempo que duro la investigación (cuadro 4).

Cuadro 4. Rangos de temperatura y humedad relativa

Lugar	Promedios de Temperatura	Promedios de humedad relativa (%)
Agencia de Extensión Agropecuaria "Las Pilas"	9 – 21° C	60 – 90%
Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) San Andrés.	20 – 28° C	70 – 80%

4.2 COMPORTAMIENTO DE LOS HONGOS UTILIZADOS EN BIOENSAYOS PRELIMINARES.

El comportamiento que tuvieron los hongos entomopatógenos evaluados sobre insectos de *Bactericera cockerelli* en los bioensayos, fue clave para identificar aquellos con los que se trabajaría en la siguiente fase. Los resultados que se obtuvieron en dichos bioensayos se muestran en el Cuadro 5. En los muestreos de campo se obtuvo una población de 36 machos y 58 hembras (adultos); la mayor presencia de hembras indica que se tiene mayor población de huevos y ninfas.

Cuadro 5. Comportamiento de los 8 hongos entomopatógenos utilizados sobre *Bactericera cockerelli* en los bioensayos.

Hongo	Estadio infectado de <i>Bactericera (Paratrioza) cockerelli</i>	Mortalidad (%)	Agresividad / crecimiento (días) (*)
<i>B. brongniartii</i>	Huevo, ninfa, adulto	100 %	5
<i>B. bassiana</i> (PROCAFE)	Adulto	10 %	10
<i>M. anisopliae</i>	Adulto, ninfa	70 %	8
<i>Paecilomyces sp.</i> (nativo Zapotitán)	Adulto	60 %	8
<i>Cladosporium sp.</i>	Adulto	10 %	15
<i>B. bassiana</i> (BAZAM)	Adulto	80 %	7
<i>M. anisopliae</i> (METAZAM)	Adulto, ninfa	90 %	7
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (PAZAM)	Adulto	80 %	7

Fuente. Elaboración propia.

- * La agresividad de un hongo entomopatógeno puede medirse a través del tiempo que tarda en crecer en un medio de cultivo las unidades formadoras de colonias, entre menos tiempo se tarde en desarrollarse y crecer se espera que sea de mayor agresividad.⁵

Como se observa en el cuadro anterior los hongos actuaron de manera distinta, algunos mas agresivos que otros, invadiendo por completo al insecto en menos tiempo que otros, como el caso de *B. brongniartii* (Fig. 41); pues éste a los seis días después de haberlo inoculado sobre el insecto presentó el porcentaje de mortalidad del 100%. Por otra parte, el producto comercial PAZAM, a base *Paecilomyces lilacinus*, produjo un efecto muy particular sobre el insecto, haciendo expulsar los huevecillos de su organismo, así como su hemolínfa a través de su aparato ovipositor, produciendo una mortalidad del 80% de los insectos (Fig. 42). Sin embargo este hongo se descarto del ensayo debido a los daños

⁵ Parada Jaco, ME, 2008. Programa de Granos Básicos del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA)

que puede ocasionar en la salud humana, pues según Navarro RJ, et al (2003), *Paecilomyces* siendo un saprófito de suelo, puede ocasionar daños en el tracto respiratorio, catéteres y piel a través de traumatismos, al ingresar al cuerpo humano a través de lesiones cutáneas, *Paecilomyces lilacinus*; también se reporta como causante de ceguera al contacto directo con los ojos.

Según lo observado entre 6 y 8 días después de haber preparado cada uno de los bioensayos; las muestras que estuvieron en la Agencia de Extensión Agropecuaria de Las Pilas, presentaban mayor crecimiento de micelio sobre el insecto, (Fig. 43, 44) con respecto a las que se ubicaron en el laboratorio de parasitología de CENTA; esto se debió a las diferencias de temperatura y de humedad relativa entre las dos zonas, pues en la Agencia de Las Pilas las condiciones de temperatura y humedad relativa eran mas favorables para el desarrollo de los entomopatógenos.



Fig. 41. Insecto adulto de *Bactericera* cubierto con micelio del hongo *B. brongniartii*.



Fig. 42. *Bactericera* adulta con micelio del hongo *Paecilomyces lilacinus* (PAZAM)



a



b

Fig. 43. Insecto adulto de *Bactericera* cubierto con micelio del hongo *M. anisopliae* (METAZAM): a) Inoculación hecha en Las Pilas; b) Inoculación hecha en laboratorio de CENTA.



a



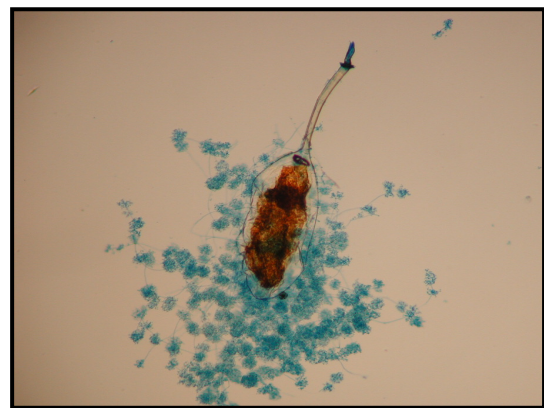
b

Fig. 44. Ninfa de *Bactericera* cubierta con micelio del hongo *B. bassiana* (BAZAM): a) Las Pilas; b) Laboratorio de Parasitología Vegetal CENTA.

Es importante mencionar que *B. brongniartii*, fue el único que infectó exitosamente a los tres estadios del insecto (Fig. 45, 46, 47), lo cual arroja un dato muy valioso sobre el potencial que mostró este hongo como controlador biológico de *Bactericera cockerelli*; ya que hasta la fecha no hay ningún producto químico que tenga efecto sobre el estadio de huevo de este insecto, pues los insecticidas son efectivos únicamente en los estadios de ninfa y adulto del insecto, por lo que se decidió llevar este hongo a la fase experimental con un diseño estadístico.



a



b

Fig. 45. Huevos de *Bactericera cockerelli* infectados por *B. brongniartii*. a) Vista en microscopio estereoscópico, b) Vista en microscopio compuesto.



a

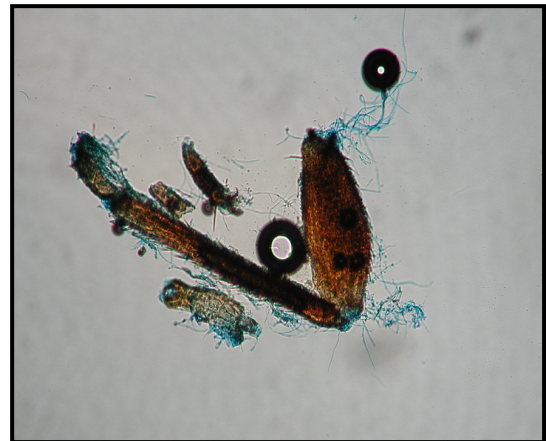


b

Fig. 46. Ninfas de *Bactericera cockerelli* infectados por *B. brongniartii*. a) Vista en microscopio estereoscópico, b) Vista en microscopio compuesto.



a



b

Fig. 47. Adulto de *Bactericera cockerelli* infectado por *B. brongniartii*. a) Vista en microscopio estereoscópico, b) Vista en microscopio compuesto de la pata posterior invadida por el hongo.

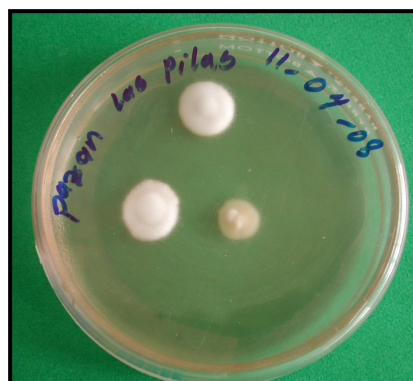
Haciendo un aislamiento de los insectos invadidos por los entomopatógenos, se comprobó si fueron o no los causantes de la muerte de los insectos, de donde se obtuvieron cultivos puros de los que mostraron efecto positivo con crecimientos miceliales, característicos de cada uno de los hongos anteriormente mencionados. (Fig. 48), y los que mostraron resultados negativos fueron descartados como los causantes de la muerte de los insectos tratados con las suspensiones preparadas con estos hongos (cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la mortalidad de los hongos entomopatógenos durante los bioensayos.

AGENTE	EFEECTO POSITIVO	EFEECTO NEGATIVO
<i>B. brongniartii</i>	X	
<i>B. bassiana</i> (PROCAFE)		X
<i>M. anisopliae</i>		X
<i>Paecilomyces sp.</i> (Nativo Zapotitán)		X
<i>Cladosporium sp.</i> (Nativo de Las Pilas)		X
<i>B. bassiana</i> (BAZAM)	X	
<i>M. anisopliae</i> (METAZAM)	X	



A



B



C



D

Fig. 48. Crecimiento de las colonias en medio de cultivo PDA, A) *Beauveria brongniartii*, B) *Paecilomyces lilacinus* (PAZAM), C) *Beauveria bassiana* (BAZAM) y D) *Metarhizium anisopliae* (METAZAM).

5. ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 POTENCIALIDAD DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EVALUADOS COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *BACTERICERA COCKERELLI*.

5.1.1 Mortalidad aparente de *Bactericera cockerelli*. (Primera lectura: cinco días después de la aplicación de los tratamientos).

Al someter los insectos a los tratamientos, con cada uno de los tres hongos entomopatógenos evaluados, se obtuvieron diferencias no significativas entre ellos, lo que indica que los tratamientos T1 (*Beauveria bassiana* BAZAM) con un porcentaje de mortalidad de 32% , T2 (*Beauveria brongniartii*) con un porcentaje de mortalidad de 48% y T3 (*Metarhizium anisopliae* METAZAM) con un porcentaje de mortalidad de 36%; no influyeron sobre la mortalidad de los insectos, debido a que en la primera lectura, no se reflejó la acción de los entomopatógenos sobre *Bactericera cockerelli*; los tres tratamientos actuaron de manera similar (Fig.49). Castillo (2001), menciona que la muerte del insecto ocurre en tres fases, donde la primera fase de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días.

El coeficiente de variabilidad de 51.60%; indica que no existió variación entre los tratamientos debido a que los entomopatógenos aun no estaban actuando como biocontroladores en su totalidad, pues las condiciones de temperatura impidieron que estos se desarrollaran al acumularse la humedad relativa dentro de las cajas Petri lo que produjo un leve incremento en la temperatura en su interior. En el testigo se observó un porcentaje de mortalidad influenciado por factores externos como la temperatura del lugar y la humedad relativa que se acumuló en las cajas Petri debido a que en este tratamiento se aplicó únicamente agua destilada estéril. Sin embargo se pudo observar que algunos insectos permanecieron más tiempo sin mostrar algún síntoma de infección por los entomopatógenos, ya que según lo mencionado por Monografías, (2006), la muerte del insecto suele ocurrir como mínimo en una semana después de la infección.

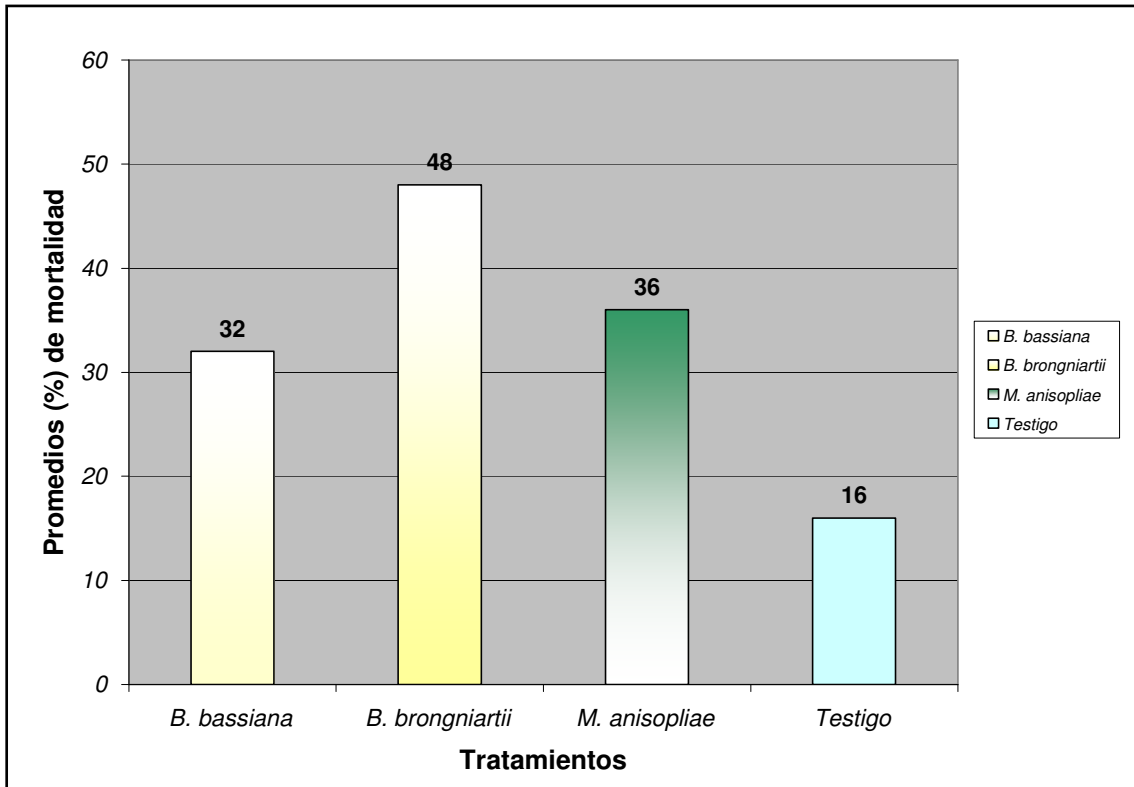


Fig. 49. Porcentaje de mortalidad aparente de *Bactericera cockerelli* ocasionada por los entomopatógenos en estudio, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Primera lectura).

5.1.2 Mortalidad aparente de *Bactericera cockerelli* (segunda lectura: diez días después de la aplicación de los tratamientos).

La segunda lectura reflejó una diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%; es decir que, la mortalidad de *Bactericera cockerelli* en las cajas Petri, fue influenciada por la acción controladora de los hongos entomopatógenos. Debido a que con diez días de acción de los hongos en el insecto han invadido sus sistemas digestivo, circulatorio, respiratorio, excretor y debilitado sus tegumentos, lo cual facilitó la observación macroscópica de la presencia micelial del hongo sobre los insectos. Según lo mencionado por Roberts y Humber, (1984); Hajek y St Legar, (1994), citados por Vargas (s.f.), la producción de toxinas en el interior del hospedero ocurre entre las primeras 48 horas después de la infección, así mismo, Castillo (2001), menciona que la patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo, por lo que según lo observado el hongo *Beauveria brongniartii* presentó mayor grado de patogenicidad.

El coeficiente de variabilidad de 21.66%; indica que existieron variaciones poco significativas entre los tratamientos que influyeron en la mortalidad de los insectos y agentes externos a la investigación, debido a que los entomopatógenos actuaron como biocontroladores con pocas diferencias entre si (Fig. 50); en el testigo (T4) se observó un porcentaje de mortalidad de 60%, siendo más elevado que la primer lectura, debido a que la acumulación de humedad relativa en la caja Petri fue mayor, mientras que el tratamiento T2 (*B. brongniartii*) fue el que presentó la mayor mortalidad de un 100% con respecto a los tratamientos T1 (*B. bassiana*) y T3 (*M. anisopliae*) que presentaron porcentajes similares entre si, de un 88% para el T1 y 84% para el T3.

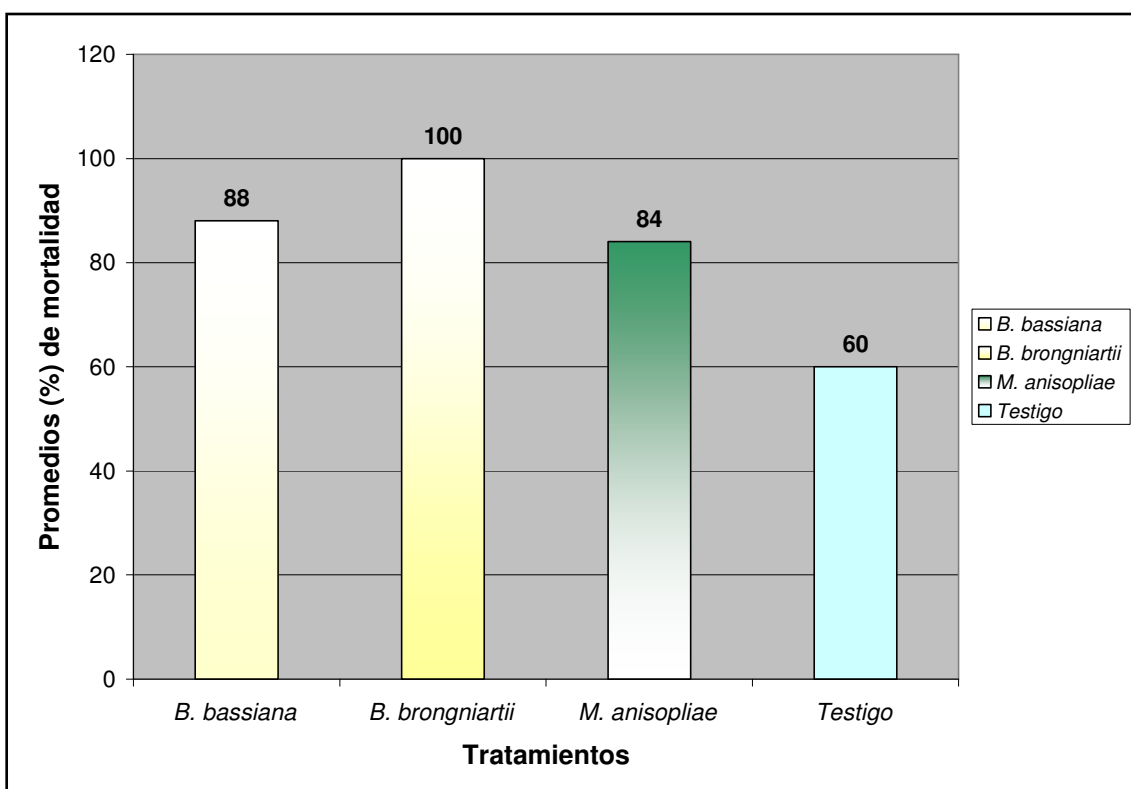


Fig. 50. Porcentaje de mortalidad aparente de *Bactericera cockerelli* ocasionada por los entomopatógenos en estudio, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Segunda lectura).

5.1.3 Mortalidad real de *Bactericera cockerelli* (primera lectura: cuatro días después del aislamiento del insecto en medio de cultivo PDA).

Los insectos muertos fueron aislados en medio de cultivo PDA para comprobar que el hongo había sido el único causante de su muerte; ya que según Roberts y Humber, (1984); Hajek y St Legar, (1994), citados por Vargas (s.f.), en condiciones de baja o moderada humedad relativa, el hongo puede permanecer en el interior del insecto sin embargo, con alta humedad el hongo crece a través de la cutícula. Llegando a obtener

resultados significativos con un nivel de significancia del 1%, lo cual indica que entre los hongos entomopatógenos evaluados hubo una diferencia en cuanto a la acción de los tratamientos sobre la mortalidad real del insecto, en la primera lectura realizada a los cuatro días, donde el tratamiento con *Beauveria brongniartii* (T2) fue el que presentó el mayor porcentaje de insectos muertos, de un 96% controlados biológicamente. Por otra parte el tratamiento con *Metarhizium anisopliae* (T3), presentó el segundo porcentaje de mortalidad real más alto con un 72%; seguido por *Beauveria bassiana* (T1) con un 44%, mostrando hasta entonces con un mejor perfil de biocontrolador al tratamiento con *Beauveria brongniartii*. De acuerdo con Castillo (2001), el micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo, observando este efecto mayormente en el hongo *Beauveria brongniartii* (Fig. 51).

El coeficiente de variabilidad de 13.34% indica que existieron diferencias bastante significativas entre los tratamientos, debido a la acción controladora que presentó cada uno de ellos sobre el insecto. Por otra parte la respuesta del tratamiento testigo (T4) con 0% de mortalidad asegura que la muerte de los insectos es debido únicamente a la acción de los hongos entomopatógenos.

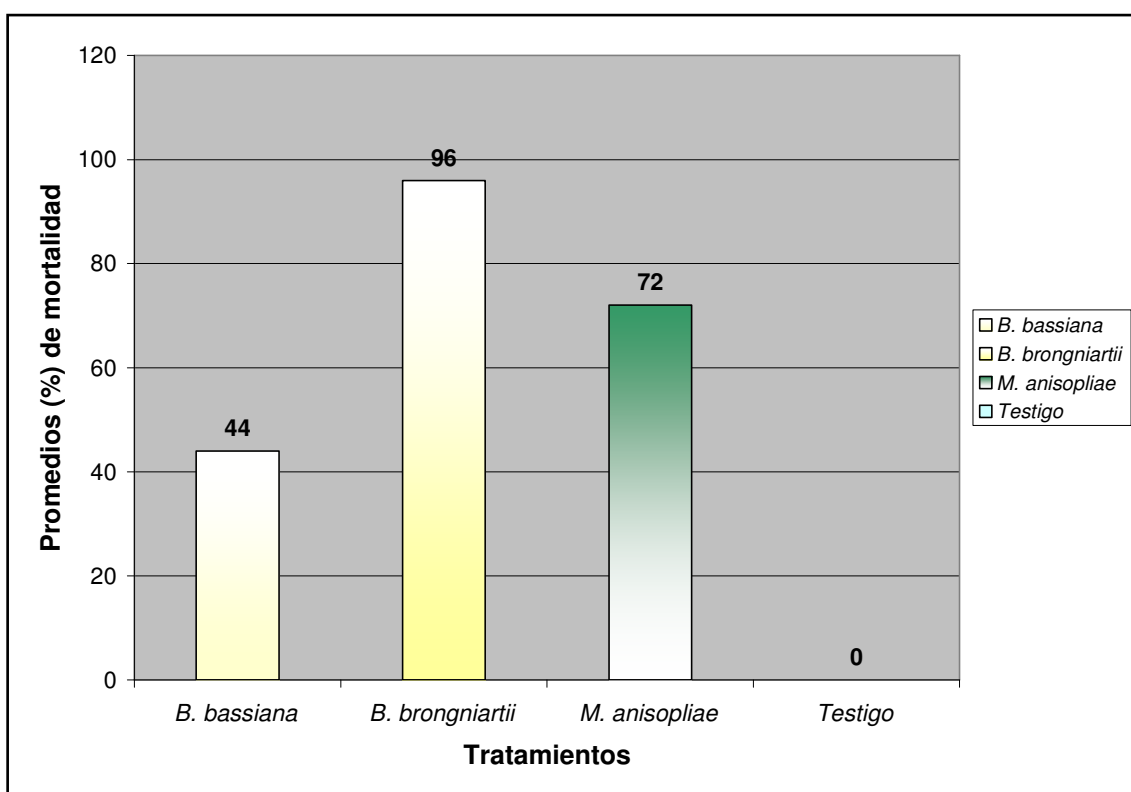


Fig. 51. Porcentaje de mortalidad real de *Bactericera cockerelli* ocasionada por los entomopatógenos en estudio, aislamientos de los insectos en medio de cultivo PDA, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Primera lectura).

5.1.4 Mortalidad real de *Bactericera cockerelli* (segunda lectura: ocho días después del aislamiento del insecto en medio de cultivo PDA).

En la segunda lectura de mortalidad real realizada a los ocho días, se obtuvieron diferencias significativas mayores entre los entomopatógenos con respecto a la primera lectura; con un nivel de significancia del 1%, lo cual indica que existió diferencia en cuanto a la acción de cada tratamiento sobre la variable. El tratamiento con *Beauveria brongniartii* (T2), siguió mostrando el porcentaje más alto de control de insectos en un 96%, seguido de *Metarhizium anisopliae* (T3) con un 76% y *Beauveria bassiana* (T1) con 64%. Arrastía, (2004), menciona que el hongo Beauveria, es uno de los patógenos más importantes que afectan insectos, ha sido recuperado de muchos insectos del orden Coleóptera, Lepidóptera y Homóptera y probablemente ataca a todos los artrópodos, por lo que su efecto como biocontrolador del insecto *Bactericera cockerelli* fue el esperado (Fig. 52). Cabe mencionar que si bien es cierto, el tratamiento con *Beauveria brongniartii* fue el superior; mantuvo su porcentaje de mortalidad con respecto a la primera lectura a diferencia de los otros dos tratamientos que en la segunda lectura aumentaron, observando el crecimiento de los entomopatógenos sobre el insecto. Obregón (s.f.), afirma que el insecto muerto queda momificado y bajo condiciones de humedad, se cubre posteriormente de una esporulación blanquecina o lila, lo que sucedió en los tratamientos con los entomopatógenos en estudio. En relación al testigo tal como en la primera lectura siguió generando la confianza que la muerte de los insectos se debió únicamente a la acción de los hongos entomopatógenos; esto según el reflejo de su porcentaje de 0% de mortalidad.

Por otra parte el coeficiente de variabilidad fue de 14.51%, lo cual es bastante significativo; reflejando la confianza sobre el resultado de los tratamientos en estudio.

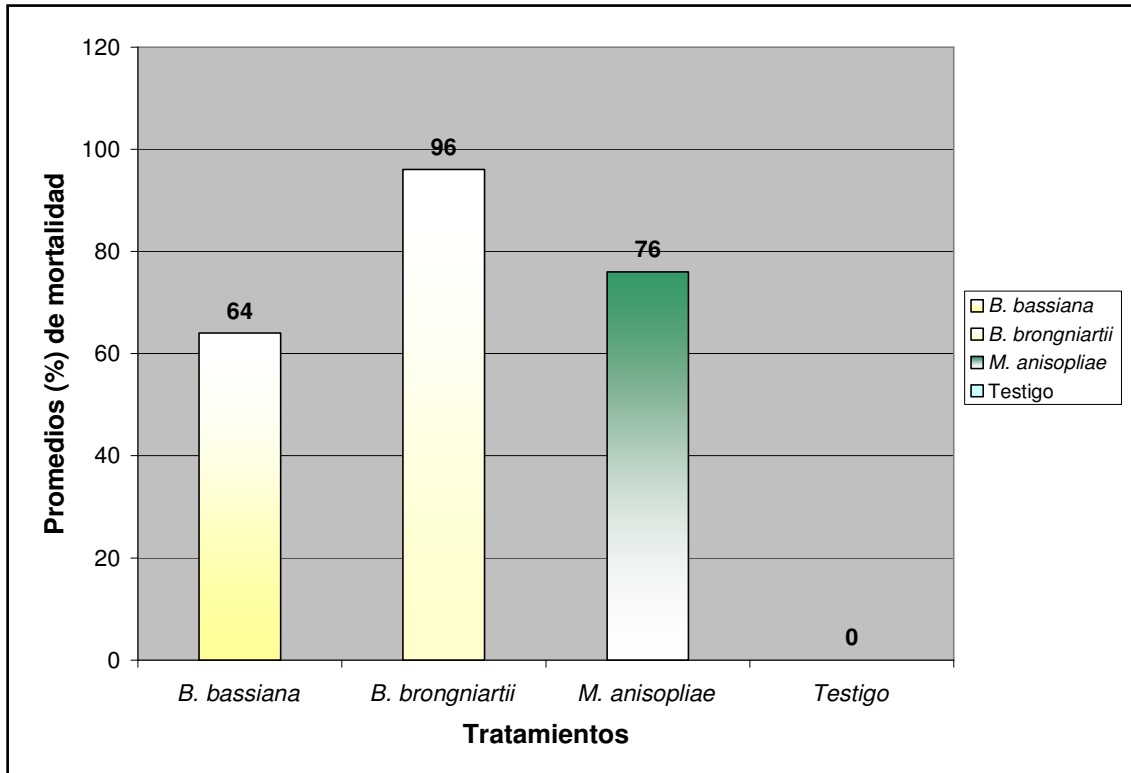


Fig. 52. Porcentaje de mortalidad real de *Bactericera cockerelli* ocasionada por los entomopatógenos en estudio, aislamientos de los insectos en medio de cultivo PDA, Laboratorio de Parasitología Vegetal, (CENTA). (Segunda lectura).

5.1.5 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Primera lectura: tres días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).

Después de haber determinado que la muerte de los insectos se debió a la acción biocontroladora de cada uno de los tratamientos en estudio, se midió su crecimiento en milímetros a través de la colonia en cajas Petri. En la primera lectura realizada a los tres días, no se obtuvo variación entre los tratamientos, lo cual indica que hubo un crecimiento micelial bastante similar entre los entomopatógenos, reflejando diferencias no significativas entre ellos. Monzón A, (2001), afirma que a una temperatura entre 24 y 28° C, durante 4 - 6 días, se observa el crecimiento del micelio. El coeficiente de variabilidad fue de 57.94%, lo que indica que no existió ninguna significación estadística entre los tratamientos, debido a que en tres días los hongos no se han desarrollado en el medio de cultivo, mostrando un crecimiento micelial mínimo, en donde el tratamiento con *M. anisopliae* (T3) se postulaba como el más agresivo hasta esta lectura con 1.6 mm de diámetro, seguido por *B. brongniartii* (T2) con 1.5 mm, *B. bassiana* (T1) con 1.2 mm y el testigo (T4) con 0.5 mm que presentaba crecimiento micelial de otros agentes

contaminantes como *Fusarium sp*, *Rhizopus sp*, *Aspergillus sp*, entre otros; (Fig. 53), así mismo estos no influyeron en la mortalidad real de los insectos.

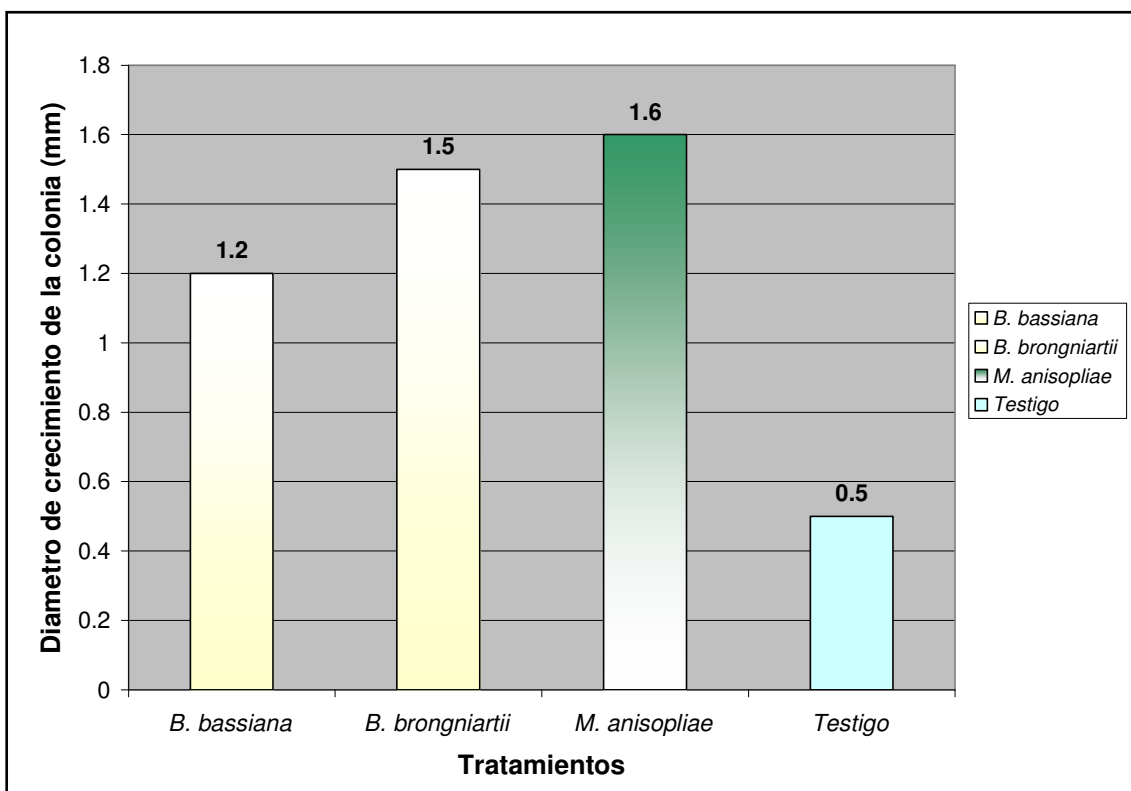


Fig. 53. Diámetros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros tres días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.

5.1.6 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Segunda lectura: cinco días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).

En la segunda lectura de la variable en estudio tomada a los cinco días se observó un incremento en el diámetro de la colonia en la caja Petri de los entomopatógenos evaluados, obteniendo diferencias significativas con el 1% de confiabilidad, aunque en esta lectura *B. brongniartii* (T2), presentó el mayor crecimiento con 5.2 mm, seguido por *B. bassiana* (T1) con 4.2 mm y *M. anisopliae* (T3) con 3.2 mm, que a diferencia de la primera lectura donde fue el de mayor crecimiento, en este caso presentó el menor promedio seguido muy de cerca del testigo (T4) con 3.0 mm que mostraba crecimiento de agentes contaminantes descritos en la primer lectura de esta variable. Romero M, Estrada ME, Castañeda RF, (1997), en su estudio sobre "Caracterización morfológica y patogénica de *Metarhizium anisopliae*", mencionan que al hacer lecturas del crecimiento

de las colonias a los 7 y 15 días se puede observar diferencias en las características morfológicas en cuanto al color de la colonia y pigmentación del medio, a diferencia de Guerrero J. Carrillo R. y Aguilera A. (1999) en su estudio sobre la “Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos”, mencionan que el hongo esporuló abundantemente en el medio (agar-dextrosa-extracto de malta-peptona) luego de 5-7 días, formando colonias circulares y extensas de textura variable y con variados matices de verde, predominando el color verde oliváceo de las masas de esporas, adquiriendo posteriormente un verde más oscuro.

Por otra parte el coeficiente de variabilidad de 16.72% nos indica que las diferencias en el crecimiento fueron bastante significativas y confiables debido a que para esta lectura los hongos ya se han desarrollado en el medio de cultivo mostrando un incremento en el crecimiento micelial y mostrando algunas de sus características como el color del micelio que para el caso de *M. anisopliae*, presentó una coloración blanca a diferencia de las dos especies de *Beauveria*, que presentaba un color cremoso. (Fig. 54)

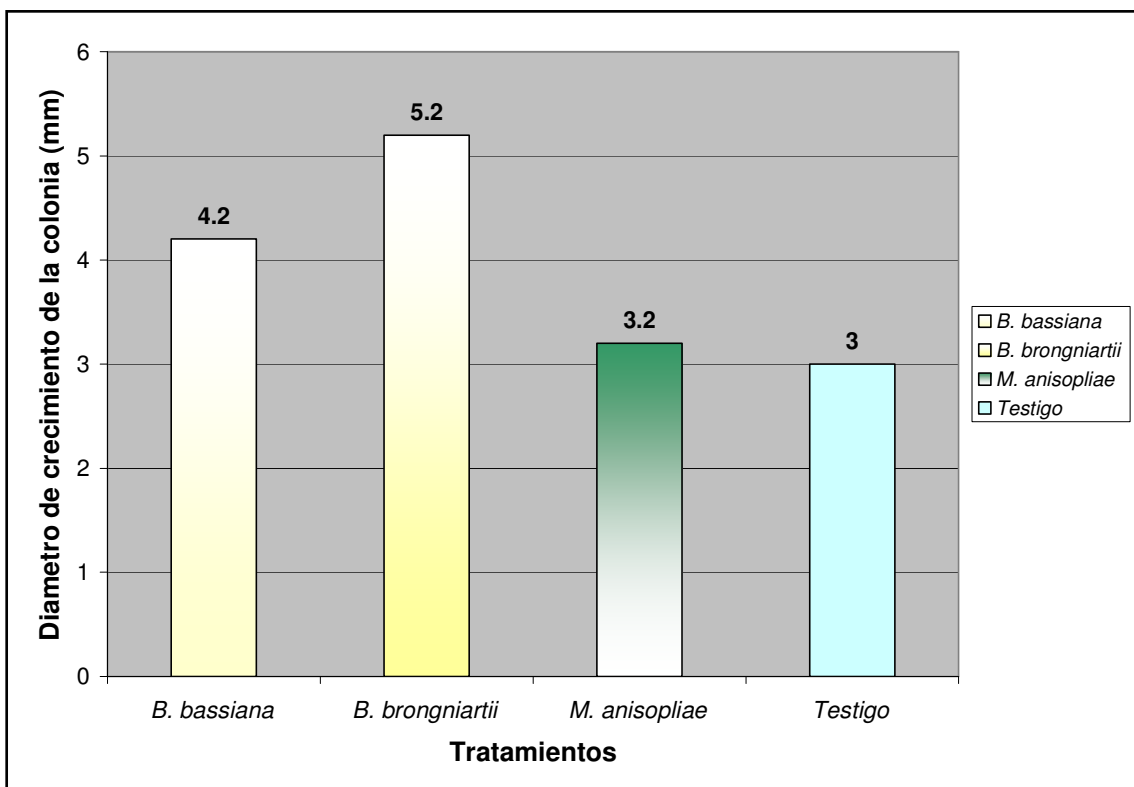


Fig. 54. Díametros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros cinco días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.

5.1.7 Diámetro del crecimiento de la colonia de los hongos entomopatógenos en milímetros. (Tercera lectura: siete días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA).

En la tercera lectura tomada a los siete días, los tratamientos continuaron su crecimiento mostrando diferencias significativas entre ellos con el 1% de significancia y un coeficiente de variación de 14.44%, indicando que hubieron diferencias bastante marcadas entre los tratamientos. En esta última lectura *B. brongniartii* (T2), continuo mostrando un mayor crecimiento con 64.8 mm y confirmando su mayor agresividad, seguido por *B. bassiana* (T1) con 45.2 mm colocándose como el segundo mas agresivo y por último *M. anisopliae* (T3) como el menos agresivo con 41.8 mm, el cual fue superado en el crecimiento por el testigo (T4) con 44.2 mm; que presentaba agentes contaminantes (Fig. 55).

Rodríguez Dos Santo, A., Del Pozo Núñez, E. (2003), mencionan en el estudio realizado sobre el “Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum*”, que al cultivar los insectos infectados con el hongo en medio de cultivo SDA a 25° C y oscuridad continua, presentan un crecimiento moderadamente rápido, 2.99 a 3.7 cm a los 10 días, con características específicas de las colonias.

En esta lectura los hongos entomopatógenos evaluados, mostraban un mejor desarrollo en el medio de cultivo PDA, observando mejor definidas las características propias de cada entomopatógeno, las especies de *Beauveria* ya presentaban un cambio en la tonalidad del micelio de un color cremoso a blanco, en el caso de *Metarhizium*, cambio su coloración de blanco a verde oscuro. France A, Gerding M y Sandoval A, (2002), mencionan características macroscópicas de las colonias del genero *Beauveria*, tales como crecimiento circular formando anillos concéntricos, la presencia de un micelio compacto, rastrero, de apariencia polvorienta y de color blanco a levemente rosado, similares a las observadas en las colonias de los tratamientos con este genero.

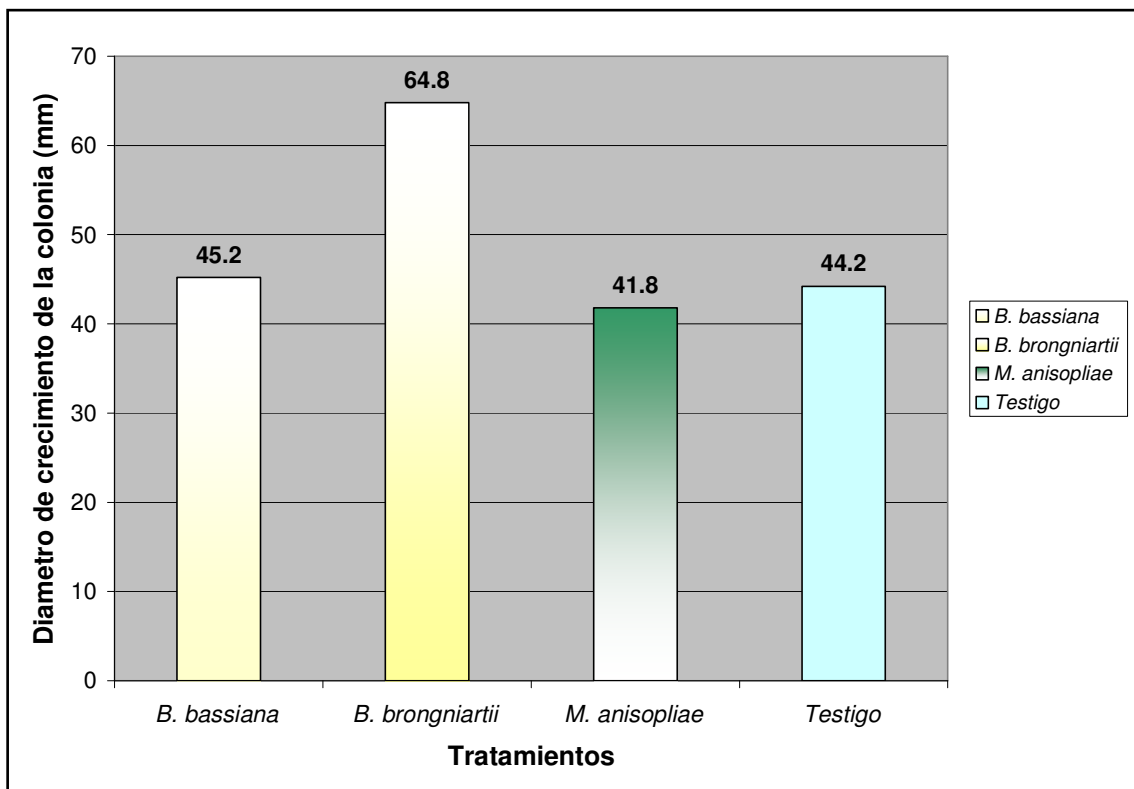


Fig. 55. Diámetros de las colonias de los hongos entomopatógenos en milímetros siete días después de inoculado el insecto en medio de cultivo PDA.

Los diámetros de las colonias de hongos en el tratamiento testigo (T4), aunque eran agentes contaminantes y no representaban ningún interés dentro de la investigación, fueron tomados como parámetros comparativos de crecimiento entre los tratamientos con los entomopatógenos evaluados y los agentes presentes en el testigo como *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp y *Rhizopus* sp.

5.2 *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en chile dulce

Durante las visitas a parcelas de los productores realizadas durante la investigación, en la fase de campo, en Marzo de 2008, se muestrearon plantaciones de chile dulce (Fig. 56); donde se encontró la presencia de la plaga *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, ocasionando daños en este cultivo como amarillamiento y acolochamiento de sus hojas; este insecto vector de fitoplasma no se tenía registrado como plaga de chile dulce, y

durante los muestreos se observó que esta afectando seriamente a los productores, ocasionando pérdidas económicas debido a los daños en el fruto y la planta en general.



Fig. 56 *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* afectando plantaciones de chile dulce: a) Marchites da plantas de chile dulce b) Hojas de chile con amarillamiento c, d) Apareamiento de adultos de *Bactericera*

5.2.1 Parasitoides de ninfas de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*

Otro resultado no contemplado dentro de la investigación, fue el hallazgo de ectoparasitoides en ninfas de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, durante los muestreos y recolección de insectos en parcelas cultivadas con papa en la zona de Las Pilas, al momento de efectuar muestreos de ninfas y huevos en hojas, fueron encontrados ectoparasitoides en el estadio de ninfa de la plaga; los cuales fueron llevados al Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), donde fueron puestos en cámara de cría, lastimosamente no pudieron ser identificados, ya que las diferencias de temperatura entre ambos lugares impidieron

que el ectoparasitoide pudiera completar su ciclo de biológico hasta su estadio adulto. Este ectoparasitoide se encontraba en la parte ventral del insecto succionando por completo la ninfa hasta dejar únicamente su exoesqueleto. (Fig. 57).



Fig. 57. Ectoparasitoides de ninfas de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* a, b) ectoparasitoide en la parte ventral de la ninfa de *Bactericera*, c, d) Ectoparasitoide luego de alimentarse de la ninfa abandona su hospedero dejando únicamente su exoesqueleto.

5.2.2 *Cladosporium sp* en moscas.

Durante las visitas a diferentes parcelas de la zona de Las Pilas en la fase de campo, específicamente en parcelas de papa, chile dulce y frijol, se observaron moscas sin identificar ancladas en el envés de las hojas, con crecimiento micelial en el abdomen (Fig. 58), estas fueron recolectadas y llevadas al Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA para su análisis. Dichas moscas fueron aisladas en medio de cultivo PDA y se determino que su muerte había sido por acción de un hongo entomopatógeno,

identificado por la Ing. Agr. Reina Flor Guzmán de Serrano como *Cladosporium sp.* (Fig. 59).



Fig. 58. Moscas muertas sin identificar infectadas por *Cladosporium sp.*



Fig. 59. Estructuras del hongo *Cladosporium sp* encontrado parasitando moscas sin identificar.

5.2.3 Inóculos del hongo *Cladosporium sp* en plantas de tomate

Por otra parte entre los diversos muestreos efectuados en la zona de Las Pilas se visito un invernadero con una plantación de tomate, se encontró nuevamente el hongo *Cladosporium sp*, esta vez parasitando ninfas y adultos de mosca blanca; se observaron pequeños inóculos del hongo sobre los insectos, los cuales fueron analizados en el Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA donde se confirmo que se trataba del hongo *Cladosporium sp* (Fig. 59) ; esto significa que siendo un hongo nativo de la zona de Las Pilas tiene la facilidad de desarrollarse e infectar diferentes hospederos, como las moscas blancas, Bactericera, moscas sin identificar donde se ha encontrado parasitando.



Fig. 60. Inóculos del hongo *Cladosporium sp* parasitando mosca blanca: a) Hoja de tomate con presencia del hongo *Cladosporium sp* b) *Cladosporium sp* parasitando ninfas de mosca blanca.

6. CONCLUSIONES

1. El hongo entomopatógeno, *Paecilomyces lilacinus*, presento características muy particulares a diferencia de otros hongos que fueron probados.
2. *Beauveria brongniartii* mostró los mejores resultados como biocontrolador de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* también ejercen el control de este insecto, aunque en un menor porcentaje de mortalidad.
3. Factores ambientales como la temperatura y humedad relativa influyeron en la mortalidad de los insectos, por lo que no se le atribuyo a los entomopatógenos la mortalidad total de *Bactericera cockerelli*, tomadas en la primer variable como mortalidad aparente.
4. En la mortalidad real, se comprobó que los insectos (*Bactericera cockerelli*) fueron muertos por los hongos entomopatógenos evaluados.
5. Se comprobó que mediante el crecimiento de las colonias de los hongos evaluados en medio de cultivo, se pude medir su agresividad sobre el insecto *Bactericera cockerelli* *Beauveria brongniartii* presento el mayor crecimiento en menor tiempo en medio de cultivo PDA, siendo el mas agresivo en comparación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
6. *Beauveria brongniartii* fue el único entomopatógeno entre los evaluados en infectar huevos, ninfas y adultos del insecto.
7. Existen otros agentes que pueden funcionar como biocontroladores de *Bactericera cockerelli* como los ectoparasitoides sobre ninfas de este insecto.
8. El hongo *Cladosporium sp*, se encontró parasitando diversas especies de insectos como mosca blanca en un cultivo de tomate y sobre una especie de mosca sin identificar en un cultivo de chile dulce.
9. La zona de las pilas cuenta una con gran biodiversidad de agentes de control con potencialidad como agentes biocontroladores de diversas plagas que afectan los cultivos de esa zona.

7. RECOMENDACIONES

1. Hacer pruebas en campo con el hongo *Beauveria brongniartii* para profundizar en el control de *Bactericera cockerelli* con este entomopatógeno.
2. Retomar investigaciones sobre el uso de entomopatógenos haciendo ensayos con el hongo *Cladosporium sp* encontrado en Las Pilas sobre mosca blanca, *Bactericera cockerelli* y otras moscas sin identificar.
3. Promover por parte de instituciones educativas y de asistencia técnica, investigaciones sobre muestreo e identificación de agentes biocontroladores que se encuentran de forma silvestre en la zona de Las Pilas.
4. La intervención de instituciones gubernamentales y no gubernamentales de manera conjunta que integren practicas que fortalezcan el manejo de plagas y enfermedades en la zona de Las Pilas.
5. Concientizar a los productores de eliminar restos de cosechas anteriores para disminuir la diseminación de plagas y enfermedades.
6. Reducir el uso de productos químicos en las plantaciones ya que esto disminuye las poblaciones de organismos benéficos como los enemigos naturales de las plagas.
7. Profundizar en el estudio del control biológico de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* utilizando enemigos como los parasitoides encontrados sobre ninfas de este insecto en el cultivo de papa.
8. Hacer estudios de inventarios de agroecológica en la zona de Las Pilas para tener una base de datos de las especies que se encuentran en el lugar, para hacer un uso racional de los cultivos.
9. Se necesita de un medio de cultivo nutritivamente enriquecido para la reproducción del hongo *Cladosporium sp*, ya que no fue posible su reproducción en los medios de cultivo como PDA y PDS.
10. Para realizar un manejo integrado de plagas eficaz, se necesitan implementar técnicas combinadas que contribuyan al control de las plagas y enfermedades así como el uso de hongos entomopatógenos acompañado de otras prácticas culturales.

8. BIBLIOGRAFIA

- Arrastía, O. A. 2004. El control biológico como estrategia en el manejo integrado de plagas. s.l. artículo (en línea). Consultado 29 de octubre de 2008. disponible en: <http://www.sappiens.com/castellano/articulos.nsf>
- Bayer CropScience, 2006. Clasificación taxonómica de Cladosporium. Bayer CENTRO AMERICA Y EL CARIBE. (en línea). s.l. Consultado 18 de febrero de. 2008. Disponible en <http://www.bayercropscience-ca.com>
- Bayer CropScience, s.f. ciclo biológico de *Paratrypana cockerelli* (en línea) consultado el 25 de febrero de 2009. Disponible en <http://www.bayer.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico>
- Blanco Pineda L.E. 2002. Determinación de la presencia de nematodos de las subfamilia heteroderinae asociados al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Palencia, Guatemala. Universidad de San Carlos. (en línea), consultado 3 de diciembre. Disponible en <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia/parasitologia/tesis4.pdf>
- Castillo Ríos J.E. 2001. Evaluación Agroeconómica de Insecticidas para el control de insectos plaga del suelo (*Scaptocoris talpa* (Hemíptera: Cydnidae) y *Agriotes spp*; *Conoderus spp* (Coleóptero: Elateridae) en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*); Concepción, Escuintla, Guatemala. Universidad de San Carlos. Tesis. (en línea). Consultada 18 de febrero de 2008. Disponible en <http://es.geocities.com/casti110/mitesis.html>
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR) 2000. Hongos entomopatógenos (en línea). Consultado 19 de octubre 2007. Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip56/art8-a.htm - 17k>
- Carreño. 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. Bogotá, D. C. Colombia. (en línea) consultado 16 de febrero de 2008. disponible en http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/tesis_irina_alean.pdf

- Cisneros, F. 1995. Control Biológico (en línea). s. l. Consultado 12 oct. 2007. Disponible en <http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA>
- Contreras M. A. (s.f.) Antecedentes sobre el origen de la papa, Universidad Austral de Chile, (en línea). Consultado 3 de diciembre de 2008. Disponible en http://www.agrarias.cl/instituto/prod_sanidad_vegetal/webpapa/anorigende.
- Covarrubias, J. M. 2005. segunda convención mundial del chile 2005. Bioecología de insectos chupadores en chile y tomate en Zacatecas, México. (en línea). Consultado 30 de Octubre de 2008. Disponible en http://www.world-pepper.org/wpc2005/memorias2005/wpc2005_Plagas.pdf
- Cortéz Román, M; Hurtado, G.2002. CENTA. Guía técnica de cultivo de Papa El Salvador. (en línea) Consultado en Septiembre de 2007. Disponible en <http://www.mag.com.sv>
- Cortéz Román, M. 2001. El psílido de la papa y el tomate, causante de punta morada. CENTA. San Andrés, El Salvador.
- DISAGRO, s.f. Boletín técnico. Productividad en el cultivo de papa, San Salvador, El Salvador.
- Estrada M.; Rico Mejia I. 2008. Síntomas asociados a cuatro niveles de infestación de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* en *solanum tuberosum* Chalatenango El Salvador. Tesis Ing. Agrónomo. San Salvador, El Salvador. UES. 19-20, p.
- Flores Oliva, A. et al. 2000. Especies de hongos de importancia (en línea). consultado el 19 de octubre de 2007. Disponible en: <http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/vermicomposta.pdf>
- Flores Oliva, A. et al s.f. Alternativas de manejo de la punta morada en la papa, disponible en: <http://www.uaaan.mx/DirInv/Carteles/ALBERTO-FLORESOLIVAS.pdf>

- France A, Gerding M y Sandoval A, 2002. Patogenicidad de aislamientos Chilenos de *Beauveria bassiana* en adultos de *Asynonychus cervinnus* (Boh.) (Coleoptera: Curculionidae). (en línea). Consultado el 14 de diciembre de 2008. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072002000400001&script=sci_arttext#samson
- Guerrero J. Carrillo R. y Aguilera A. 1999. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. Universidad Austral de Chile. (en línea). Consultado el 12 de noviembre de 2008. Disponible en http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88021999000200003&lng=es&nrm=iso
- Guzmán de Serrano, R.F, 2008. Diagnostico fitopatologico en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en la zona alta de Chalatenango, El Salvador. Cooperación Proyecto CENTA – SINALIT. Presentación Power point.
- Infoagro.com S.f. El cultivo de la patata, taxonomía y morfología de la patata. S.L. (en línea). Consultado 3 de diciembre de 2008. disponible en <http://servicios.hoy.es/canalagro/datos/hortalizas/patata.htm>
- Koppert Biological Systems, 2008. Paratrioza (Bactericera) cockerelli adult. s.l. (en línea) Consultado 25 de febrero de 2009. Disponible en www.koppert.com
- MARN-IABIN, Ficha Técnica-Proyecto Especies Invasoras, 2001, disponible en; <http://www.iabinus.org/projects/i3n/i3nproductafterpilot/elsalvadorcd/faunain/paratriozacockerelli>.
- Mejia A.C.; et al. 1992. Áfidos como vectores de virus en México: Contribución a la ecología y control de áfidos en México. Eds. C Urias; R Rodríguez; T Alejandro. Volumen 1.
- Monografías, 2006. Uso de hongos entomopatógenos. (en línea). s.l. Consultado 17 de dic. 2007. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos29/hongosentomopatogenos/hongos-entomopatogenos.shtml>

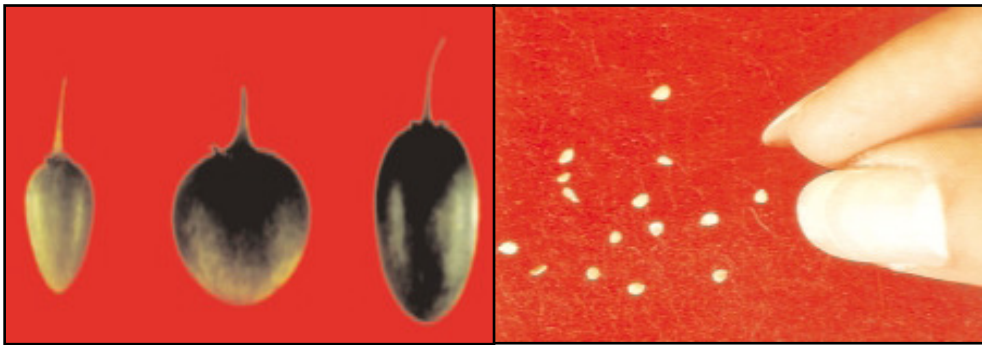
- Monzón A, 2001. CATIE-gtz. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua, manejo integrado de plagas. Costa Rica. (en línea). Consultado el 22 de octubre de 2008. Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev63/pag95-103.pdf>
- Navarro RJ, et al, 2003. Revista Médica de Chile; Formas clínicas de *Paecilomyces*. (en línea). Consultado el 1 de marzo de 2008. Disponible en www.u-cursos.cl/medicina/2008/2/TM1MICR23/1/material_alumnos/previsualizar.
- Obregón. s.f. Laboratorio Dr. Obregón. Bioprotection / *Paecilomyces fumosoroseus*. Hongo entomopatógeno Control biológico de plagas agrícolas. s.l. (en línea).consultado 16 de febrero de 2008. Disponible en <http://doctor-obregon.com/Paefumosoroseus.aspx>
- Oklahoma State University, 2009. Entomology and Plant Pathology, Potato or Tomato Psyllid, *Paratrioza cockerelli*. (en línea). Consultado 25 de febrero de 2009. Disponible en <http://www.ento.okstate.edu/ddd/IMAGES/potatopsyllid.jpg&imgrefurl>
- Panames Guerrero, A. s.f. Uso potencial de especies del león de los áfidos como agentes de control biológico del psilido de la papa *Paratrioza cockerelli* (en línea). Consultado 13 de dic. 2007. (Sulc). disponible en; http://www.uaaan.mx/DirInv/Resul_PI04/MEMORIA_2004/ParasitAgricola
- Parada Jaco, M.E...; Guzmán de Serrano, R.F.1998. hongos entomopatógenos, una alternativa para controlar insectos. Unidad de comunicaciones de CENTA. San Andrés, la libertad, el salvador Pág. 6 - 8
- Rodríguez Dos Santo, A., Del Pozo Núñez, E. 2003.Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum*. (en línea) consultado 12 de diciembre de 2007. disponible en <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/VOL7/2/p71-78.pdf>
- Rodríguez Maciel, J.C. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (sulc) (hemiptera: triozidae). Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México (en línea). Consultado 4 de diciembre de 2008. Disponible en <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2008/may-jun/art-9.pdf>

- Romero M, Estrada ME, Castañeda RF, 1997. Caracterización morfológica y patogénica de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, Cuba. (en línea). Consultado el 23 de noviembre de 2008. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/canadeazucar/cana1501/texto/caracterizacion.htm>
- SALAZAR L F. s.f. Identificación y control de enfermedades virales y fitoplasmas de la papa. Lima, PERU. (en línea). Consultado 18 de Febrero de 2008. disponible en <http://www.redepapa.org/salazar1.pdf> *
- SALAZAR L F. s.f. Identificación y control de enfermedades virales y fitoplasmas de la papa. Lima, Perú. (en línea). Consultado 18 de Febrero de 2008. disponible en <http://www.condesan.org/e-foros/InfoPapa/papa27.htm> **
- SENASA s.f. sanidad vegetal. Control biológico, *Paecilomyces fumosoroseus*. (en línea). Consultado 25 de Octubre 2008. Disponible en <http://www.senasa.gob.com>
- Tipismana, CE. 2005. Hongos de importancia agrícola presentes en mosca de la fruta del valle del ICA Perú. (en línea) Consultado 29 de Octubre 2007. disponible en <http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Torres, Ortega, Alcázar, Ames, Palomino, 1993. Control biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) con *Beauveria brongniartii*. Guía de investigación. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. (en línea). Consultado 15 de diciembre de 2008. disponible en <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/ResGuide43860.pdf>
- University of California, 2009. Department of entomology, The Tomato Psyllid: A NEW PROBLEM on Fresh Market Tomatoes in California and Baja Mexico. (en línea). Consultado el 25 de febrero de 2009. Disponible en <http://ceventura.ucdavis.edu/files/21333.jpg>
- Vargas Flores, ME. s.f. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* y su virulencia en *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias* Cap. 2 documento en pdf. s.l. (en línea). Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/vargas_fm/Cap2.pdf

- Wikipedia, enciclopedia libre, s.f. Solanum tuberosum. (en línea). Consultado el 3 de diciembre de 2008. disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_tuberosum
- Wikipedia, enciclopedia libre, s.f. Fitoplasma. (en línea). Consultado el 3 de diciembre de 2008. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Fitoplasma>
- Martínez Barahona, J.O., 2003. Hongos entomopatógenos *Paecilomyces* prob. *fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* en el manejo de mosca blanca *Bemisia tabaci* en el cultivo de pepino *Cucumis sativus*; en el valle de Zapotitán. San Vicente, El Salvador.

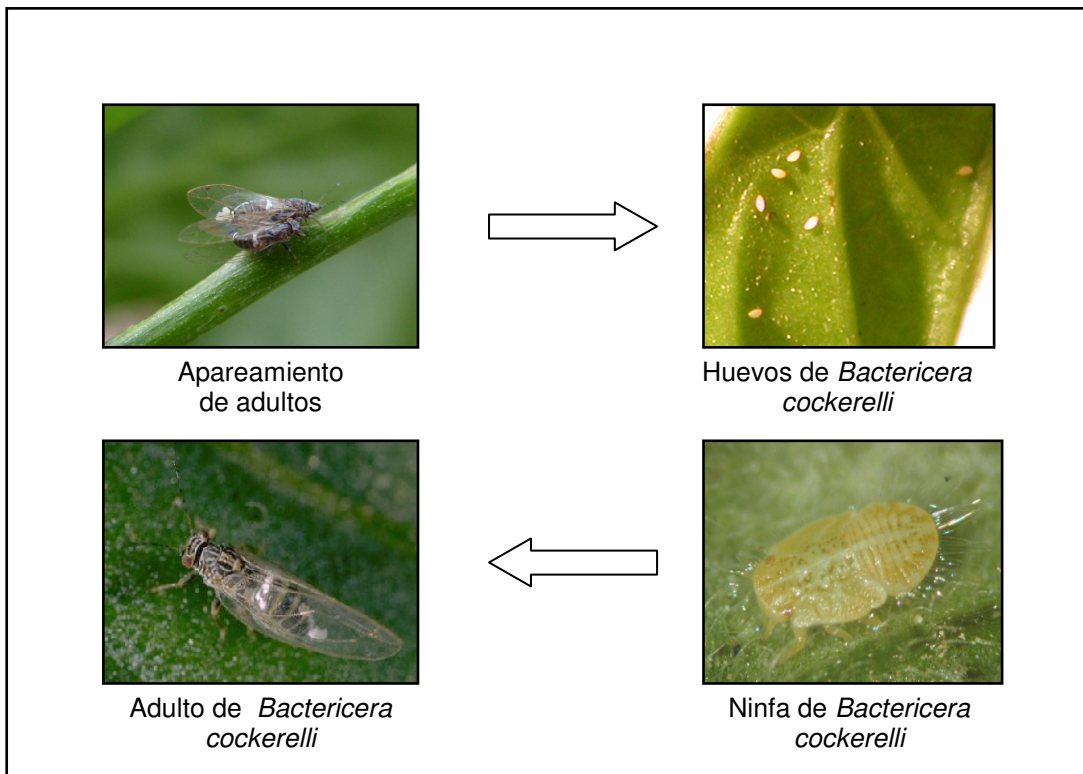
9. ANEXOS

Anexo 1. Semilla de papa.



Fuente: (Cortéz y Hurtado.2002).

Anexo 2. Ciclo biológico de *Bactericera cockerelli* observado en campo.



Anexo 3. Síntomas de fitoplasma observados en campo.



Aro necrótico en el tubérculo



Tubérculo con brote de hilos

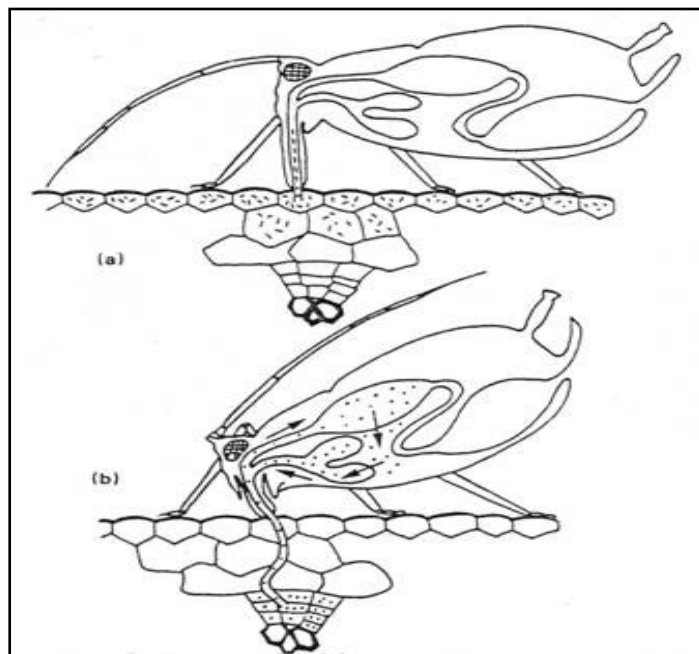


Tubérculo con exceso de brotes



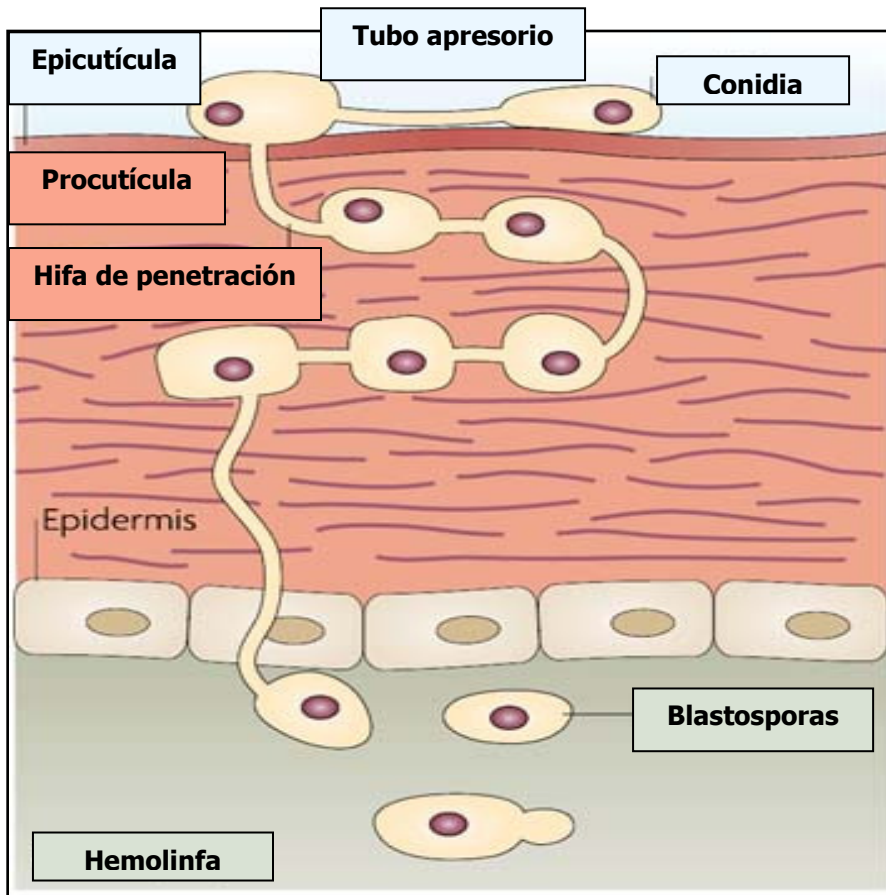
Tubérculos aéreos

Anexo 4. Mecanismo de adquisición de virosis y fitoplasma por los áfidos (a) Virus transportados por el estilete, tipo no persistente. (b) virus de tipo circulativo o persistentes



Fuente: www.ocwus.us.es

Anexo 5. Modo de acción de los hongos entomopatógenos



Fuente: www.nature.com

Anexo 6. Pasos para el montaje de bioensayos

1. Obtención de material biológico: (hongos biocontroladores).
2. Recolección de insectos.
3. Material y equipo para la recolección de insectos:
 - Red entomológica.
 - Succionadores entomológicos.
 - Jaulas de transporte de insectos.
 - Papel toalla.
 - Viñetas, plumones, lapicero.
4. Material y equipo de laboratorio necesario:
 - Cajas Petri.
 - Papel filtro.
 - Papel parafilm.
 - Aza bacteriológica.
 - viales.
 - Agitador vortex.

- goteros.
- Beaker 50 y 200 ml.
- Balón volumétrico.
- Earlenmeayer.
- Pipetas de 10 y 1 ml.
- Autoclave.
- Incubadora.
- Cámara de flujo laminar.
- Balanza semianalítica.
- Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Alcohol etílico.
- Dispersante de esporas (Tween).
- Agua destilada estéril.
- Papel toalla, papel aluminio.
- Viñetas, plumones, tijeras, lapicero.
- Mechero

5. Procedimiento:

- Preparar las soluciones de los hongos, en la cámara de flujo laminar, haciendo diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 agregando 1 de hongo en 9 ml de agua destilada estéril.
- Colocar las diluciones de los respectivos hongos en frascos goteros e identificarlos.
- Preparar las Cajas Petri colocando papel filtro en su interior, poner una hoja del cultivo (papa, chile, tomate, otros) para que le sirva de alimento mientras el entomopatógeno hace efecto, añadir la dilución del hongo entomopatógeno (cantidad de gotas) sobre el papel filtro y colocar los insectos dentro de la caja sellarla con el papel parafilm e identificar colocando patógeno, lugar, fecha del montaje
- Observar diariamente el comportamiento de los insectos y el desarrollo de los hongos.

6. Aislamiento de los insectos muertos en Medio de cultivo PDA

- Esterilizar los materiales Cajas Petri, medio de cultivo, azas bacteriológicas y agua destilada en Autoclave.
- En cámara de flujo laminar desinfectar los insectos pasándolos 30 segundos por alcohol, lejía y agua destilada; luego ponerlos sobre papel filtro para que no tengan exceso de humedad, cerca de la llama de seguridad del mechero.
- Tomarlos con la aza bacteriológica, y ponerlos en la caja Petri sobre el medio de cultivo (PDA), sellarlo con papel parafilm e identificarlo.
- Colocarlo en incubadora y observar el crecimiento del patógeno a los cinco días después de inoculado.

Cuadro A 1. Variedades y mejoramiento genético de papa.

Características	Variedades		
	Icta frit	Atzimba	Tollocan
Adaptación (msnm)	1800 a 2,800	460 a 3,000	1,400 a 2,500
Altura de planta (m)	0.80 - 1.00	0.70 - 0.80	0.75 - 0.85
Tallos	Erectos, robustos	Erectos, fuertes y con la madurez se vuelven rastreros	Erectos, robustos
Color del follaje	Verde	Verde pálido	Verde oscuro
Color de la flor	Morado	Blanco	Blanco
Color del tubérculo	Beige - amarillento	Amarillo - crema	Amarillo - crema
Forma del tubérculo	Alargado y ligeramente aplanado	Redondo - alargado	Redondo - aplanado
Color interno del tubérculo	Crema - amarillento	Crema	Amarillo
Ojos y yemas	Superficiales	Poco profundo	Poco profundo
Ciclo (días)	120	90 - 110	100 - 110
Resistencia a tizón	Susceptible	Moderadamente susceptible	Tolerante
Rendimiento (TM/ha)	19.5 - 32.5	19.5 - 32.5	26 - 39
Aceptación culinaria	Muy aceptable	Aceptable	Aceptable
Susceptibilidad al verdeo	Poca	Mucha	Regular
Distanciamiento de siembra recomendado (m)	1.00-1.20x0.25-0.30	0.90x0.25-0.30	0.80-0.90x0.25-0.30

Fuente: Cortéz y Hurtado.2002.

Cuadro A 2. Hoja de toma de datos de ensayo estadístico.

Gerencia de Investigación Tecnológica, CENTA									
Unidad de Biometría y Socioeconomía									
Programa: Parasitología					Proyecto: Tesis		Titulo: Hongos entomopatógenos		
Fecha de Siembra: 20-07-08				Fecha de entrega de datos:	27/11/2008	Responsable: Alejandra G. Menjívar Silis			
Diseño estadístico: Diseño Completamente al Azar								No. De hoja	
Repeticiones	Tratamientos	% Mortalidad aparente 1	% Mortalidad aparente 2	Diámetro de colonia 1/ml	Diámetro de colonia 2/ml	Diámetro de colonia 3/ml	% de mortalidad real	% de mortalidad real	
1	1	20	100	0	5	50	40	60	
1	2	60	100	1.5	6	60	100	100	
1	3	20	100	2.5	4	30	80	80	
1	4	40	40	0.5	3	40	0	0	
2	1	20	100	1	4	40	40	60	
2	2	40	100	2	6	70	100	80	
2	3	20	80	1.5	4	35	60	60	
2	4	20	100	1	4	47	0	0	
3	1	60	100	2	5	43	60	80	
3	2	80	100	1.5	5	63	100	100	
3	3	40	60	1	3	54	80	100	
3	4	20	40	0	2	47	0	0	
4	1	40	60	1	3	48	40	60	
4	2	40	100	1	5	69	100	100	
4	3	60	100	2	3	51	80	60	
4	4	0	60	1	3	36	0	0	
5	1	20	80	2	4	45	40	60	
5	2	20	100	1.5	4	62	80	100	
5	3	40	80	1	2	39	60	80	
5	4	0	60	0	3	51	0	0	

Cuadro A 3. Análisis de varianza

Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente primera lectura

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	2120.00	530.000	1.83	0.1884
Tratamientos	3	2620.00	873.333	3.01	0.0721ns
Error	12	3480.00	290.000		
Total	20 - 1 = 19	8220.00			

Coeficiente de variación.= 51.60%

Cuadro A 4. Análisis de varianza

Variable: Porcentaje de Mortalidad Aparente segunda lectura

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	920.00	230.000	0.71	0.5998
Tratamientos	3	4220.00	1406.667	4.35	0.0272*
Error	12	3880.00	323.333		
Total	20 - 1 = 19	9020.00			

Coeficiente de variación.= 21.66%

Cuadro A 5. Análisis de varianza

Variable: Diámetro de micelio de colonia primera lectura 1mm

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	0.20	0.050	0.10	0.9791
Tratamientos	3	3.70	1.233	2.55	0.1046ns
Error	12	5.80	0.483		
Total	20 - 1 = 19	9.70			

Coeficiente de variación.= 57.94%

Cuadro A 6. Análisis de varianza

Variable: Diámetro de micelio de colonia segunda lectura 2mm

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	5.30	1.325	3.12	0.0564
Tratamientos	3	15.40	5.133	12.08	0.0006**
Error	12	5.10	0.425		
Total	20 - 1 = 19	25.80			

Coeficiente de variación.= 16.72%

Cuadro A 7. Análisis de varianza

Variable: Diámetro de micelio de colonia tercera lectura 3mm

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	114.50	28.625	0.57	0.6883
Tratamientos	3	1694.80	564.933	11.29	0.0008**
Error	12	600.70	50.058		
Total	20 - 1 = 19	2410.00			

Coeficiente de variación.= 14.44%

Cuadro A 8. Análisis de varianza

Variable: Porcentaje de Mortalidad Real primera lectura

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	520.00	130.000	2.60	0.0895
Tratamientos	3	25500.00	8500.000	170.00	0.0000**
Error	12	600.00	50.000		
Total	20 - 1 = 19	26620.00			

Coeficiente de variación.= 13.34%

Cuadro A 9. Análisis de varianza

Variable: Porcentaje de Mortalidad Real segunda lectura

Fuente de Variación	G L	SC	CM	Fcal.	Probabilidad
Repeticiones	4	880.00	220.000	3.00	0.0625
Tratamientos	3	25820.00	8606.667	117.36	0.0000**
Error	12	880.00	73.333		
Total	20 - 1 = 19	27580.00			

Coeficiente de variación.= 14.51%

Cuadro A 10. Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de mortalidad aparente (segunda lectura)

PRUEBA DE DUNCAN		
Variable: Porcentaje de mortalidad aparente (segunda lectura)		
TRATAMIENTO	MEDIA	EFECTO
<i>B. brongniartii</i>	100	A
<i>B. bassiana</i>	88	A
<i>M. anisopliae</i>	84	A
Testigo	60	B

Cuadro A 11. Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Diámetro de colonia (segunda lectura)

PRUEBA DE DUNCAN		
Variable: Diámetro de colonia (segunda lectura)		
TRATAMIENTO	MEDIA	EFECTO
<i>B. brongniartii</i>	5.2	A
<i>B. bassiana</i>	4.2	AB
<i>M. anisopliae</i>	3.2	B
Testigo	3.0	B

Cuadro A 12. Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Diámetro de colonia (Tercera lectura)

PRUEBA DE DUNCAN		
Variable: Diámetro de colonia (Tercera lectura)		
TRATAMIENTO	MEDIA	EFECTO
<i>B. brongniartii</i>	64.80	A
<i>B. bassiana</i>	45.20	B
Testigo	44.20	B
<i>M. anisopliae</i>	41.80	B

Cuadro A 13. Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Mortalidad real (Primera lectura)

PRUEBA DE DUNCAN		
Variable: Mortalidad real (Primera lectura)		
TRATAMIENTO	MEDIA	EFFECTO
<i>B. brongniartii</i>	96.0	A
<i>M. anisopliae</i>	72.0	B
<i>B. bassiana</i>	44.0	C
Testigo	0.0	D

Cuadro A 14. Prueba estadística de DUNCAN de Análisis de Varianza para la variable Mortalidad real (Segunda lectura)

PRUEBA DE DUNCAN		
Variable: Mortalidad real (Segunda lectura)		
TRATAMIENTO	MEDIA	EFFECTO
<i>B. brongniartii</i>	96.0	A
<i>M. anisopliae</i>	76.0	B
<i>B. bassiana</i>	64.0	B
Testigo	0.0	C