

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA- LEÓN.  
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA.**



**Evaluación de la patogenicidad y esporulación (Cepa Bisa-01-Metarhisa) de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin Sobre ninfas de salivita (*Aeneolamia varia*) en el laboratorio de hongo entomopatógeno del campus agropecuario, UNAN-LEÓN, 2008.**

**PREVIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERÍA EN AGROECOLOGÍA  
TROPICAL.**

**Presentado por:**

Br. José Emilio Barahona Hernández.  
Br. Ignacio Valentín Campos Pacheco.

**Tutor:**

Lic. Marcia Gómez Vega.

**Asesor:**

Ing. Luís Francisco Moreno.

**León, 2008**

## ÍNDICE

Resumen .....	i
Agradecimiento .....	ii
Dedicatoria .....	iii-iv
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	3
III. Hipótesis .....	4
IV. Marco teórico .....	5
4.1 Origen de la caña de azúcar .....	5
4.1.1 Taxonomía de la caña de azúcar .....	5
4.1.2 Requerimiento Agroecológico de la caña de azúcar .....	5
4.1.3 Variedades de <i>Saccharum officinarum</i> susceptibles <i>Aeneolamia varia</i> .....	6
4.2 Generalidades del <i>Aeneolamia varia</i> .....	6
4.2.1 Distribución geográfica y hospedante del <i>Aeneolamia varia</i> .....	6
4.2.2 Taxonomía del <i>Aeneolamia varia</i> .....	7
4.2.3 Ciclo de vida del <i>Aeneolamia varia</i> .....	7
4.2.3.1 Huevo .....	8
4.2.3.2 Ninfa .....	9
4.2.3.3 Adulto .....	11
4.2.4 Reproducción y sitios de ovoposición del <i>Aeneolamia varia</i> .....	11
4.2.5 Patrones de comportamiento y distribución espacial del <i>Aeneolamia varia</i> .....	12
4.3 Control Microbial .....	13
4.3.1 Hongo <i>Metarhizium Anisopliae</i> .....	13
4.3.2 Morfología .....	13
4.3.3 Taxonomía .....	14
4.3.4 Patogenicidad y virulencia .....	14
4.3.5 Ciclo de vida del <i>Metarhizium Anisopliae</i> .....	14
4.3.6 Modo de acción de <i>Metarhizium Anisopliae</i> .....	15
4.3.6.1 Germinación de las conidias .....	15
4.3.6.2 Formación de esporas .....	15
4.3.6.3 Penetración .....	15
4.3.6.4 Colonización .....	16
4.3.6.5 Reproducción del patógeno .....	16
4.3.7 Toxinas .....	16
4.3.8 Modo de entrada .....	16
4.3.9 Sintomatología .....	17
4.3.10 Toxicidad para otros organismos .....	17
4.3.11 Ventaja de hongo entomopatógeno .....	17
4.3.12 Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos .....	17
4.3.13 Uso actual y futuro de entomopatógeno .....	17
V Materiales y Métodos .....	19
5.1 Colección de insectos .....	19
5.2 Desinfección del alimento .....	19
5.2.1 Preparación de la suspensión fungosa .....	19
5.2.2 Medición de la concentración de la suspensión fungosa .....	20
5.2.3 Conversión de concentraciones .....	20
5.2.4 Prueba de viabilidad .....	20
5.3 Montaje de bioensayo .....	21
5.3.1 Lectura del bioensayo .....	21
5.3.2 Medición de la esporulación .....	21
VI Resultados y Discusión .....	22
6.1 Medición de la concentración de la suspensión fungosa .....	22
6.2 Prueba de viabilidad .....	22

6.3 Porcentaje de mortalidad del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> en concentración $10^8$ conidias/ml.....	23
6.4 Porcentaje de mortalidad del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> en concentración $10^9$ conidias/ml.....	24
6.5 Porcentaje de mortalidad del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> en concentración $10^{10}$ .....	25
6.6 Porcentaje de mortalidad del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> en tres concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml.....	26
6.7 Porcentaje de esporulación del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> en tres concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml.....	27
6.8 Comparación porcentual de la mortalidad y esporulación de las concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	28
VII. Conclusiones .....	29
VIII. Recomendaciones .....	30
IX. Bibliografía .....	31
X. Anexos .....	32

### ÍNDICE DE FIGURA.

Rangos de variación de las etapas del ciclo de vida de la salivita <i>Aeneolamia varia</i> .....	8
--	---

### ÍNDICE DE TABLA.

Tabla N°1. Comparación de mortalidad y esporulación de las concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	28
--	----

### ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico N° 1. Mortalidad de <i>Aeneolamia varia</i> utilizando la concentración $10^8$ conidias/ml del hongo Bisa -01- Metharisa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en condición de laboratorio UNAN-LEON 2008.....	23
---	----

Gráfico N° 2. Mortalidad de <i>Aeneolamia varia</i> utilizando la concentración $10^9$ conidias/ml del hongo Bisa -01- Metharisa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en condición de laboratorio UNAN-LEON 2008.....	24
---	----

Gráfico N° 3. Mortalidad de <i>Aeneolamia varia</i> utilizando la concentración $10^{10}$ conidias/ml del hongo Bisa -01- Metharisa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.....	25
--	----

Gráfico N° 4. Mortalidad de <i>Aeneolamia varia</i> utilizando la concentración $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml del hongo Bisa -01- Metharisa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en condición de laboratorio UNAN-LEON 2008.....	26
---	----

Gráfico 5. Esporulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ninfas de <i>Aeneolamia varia</i> Utilizando la concentración $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml del hongo Bisa -01- Metharisa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.....	27
--	----

## Resumen

El uso indiscriminado de pesticidas químicos, ha conllevado, que la producción de hongos entomopatógenos tome auge en nuestro país, siendo estos efectivos como los es el *Metarhizium anisopliae* el cual es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado para el control microbiano y el más usado en Latinoamérica para el control de muchas especies de cercopídeos que son plagas de *Saccharum officinarum*. Ante lo expuesto se realizó un experimento en el laboratorio de hongo entomopatógeno de la UNAN- León, con una temperatura de 27°C y una humedad relativa entre 75-80% con el objetivo de determinar la patogenicidad y esporulación de la cepa de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones que son  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml sobre ninfas de *Aeneolamia varia*. En el presente trabajo se llevó a cabo la recolección de la *Aeneolamia varia* la cual se tomó de las plantas de *Saccharum officinarum* variedad mexicana situada en la parcela, El Ayote en el Ingenio San Antonio a 5 km de Chichigalpa, luego se procedió a la preparación de la suspensión fungosa en donde se tomaron 4 gramos del hongo BISA -01- Metarhiza, más 260 ml de agua estéril se agitó hasta obtener una suspensión fungosa homogénea. El bioensayo consistió en la inmersión de las ninfas *Aeneolamia varia* en la suspensión fungosa, al tercer día se realizó la lectura de mortalidad que fue el 04 de noviembre del 2008, las lecturas se iban realizando cada dos días 6, 8, 10, 11 de noviembre, hasta el día once que fue el 12 de noviembre del 2008. Luego los insectos muertos se montaron en cámaras húmedas por un periodo de 8 a 12 días para ver la esporulación del hongo. Como resultado se obtuvo que la concentración  $10^{10}$  conidias/ml obtuvo mortalidad de 100%, las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml obtuvieron 100% y 100% respectivamente, en cuanto a la esporulación la concentración  $10^{10}$  conidias/ml obtuvo el porcentaje mayor con un 56%,  $10^9$  conidias/ml un 30.6% y  $10^8$  conidias/ml un 21.3%. Por lo tanto la concentración  $10^{10}$  conidias/ml fue la más eficaz para el control de la *Aeneolamia varia*. Estos resultados señalan que a mayor concentración del hongo, tiene mayor efectividad sobre el control de la *Aeneolamia varia*.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por habernos dado fuerzas en todos los momentos de nuestras vidas y en este trabajo que con mucho empeño realizamos.

Queremos agradecer de manera especial a nuestra tutora Lic. Marcia Gómez que con mucho empeño, tiempo y paciencia nos brindó su amplio conocimiento de forma desinteresada para elaborar y culminar el trabajo de investigación presente.

A nuestro asesor Ing. Luis Francisco Moreno por habernos brindado su ayuda con sus conocimientos y sugerencias.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo que he realizado con empeño y dedicación quiero dedicarlo, primeramente a:

Dios nuestro Padre eterno, por haberme dado fuerza de voluntad, fe para lograr los objetivos propuestos a lo largo del camino y llegar con éxito hasta el final.

A mis padres Sr. Carlos Barahona y Sra. Artemisa Hernández con el cariño y respeto que siempre han merecido, ya que con tanto sacrificio, abnegación y apoyo me guiaron, para hacer de mi persona útil y a ellos se lo dedico como fruto de lo que soy ahora persona digna ante la sociedad.

**José Emilio Barahona Hernández**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo el cual fue realizado con mucho entusiasmo y empeño se lo dedico primeramente a:

Dios nuestro señor por darme fortaleza y permitirme levantarme con fe y ánimo para subir un peldaño más hacia el futuro y llegar a mi meta final.

A mi madre Yamileth Pacheco y a mi padrastro Marino Castrillo por la educación, amor, respeto y apoyo incondicional que siempre me han dado en buenos y malos momentos por eso a ellos le dedico este triunfo en la vida que no es solo mío si no de ellos también gracias.

**Ignacio Valentín Campos Pacheco.**

## I. Introducción.

En Nicaragua, el cultivo de la caña de azúcar *Saccharum officinarum* es un cultivo que ha venido ganando importancia en el transcurso del tiempo, esto se debe a la extensión de las grandes empresas que utilizan este rubro, como es el caso del Ingenio San Antonio.

*Saccharum officinarum* es un cultivo de entre 11 y 17 meses en dependencia de la variedad, es originaria del sureste de Asia, desde su descubrimiento, el jugo proveniente de su tallo es utilizado como fuente de azúcar. ([www.nicaraguasugarestates.com](http://www.nicaraguasugarestates.com))

Debido a las grandes extensiones de tierra que se cultivan con caña de azúcar y a la gran demanda que existe del azúcar como tal, los productores se ven obligados a utilizar diferentes mecanismos para lograr aumentar su producción, entre estos está la utilización de controladores biológicos, como el hongo *Metarhizium anisopliae* para ayudar a controlar *Aeneolamia varia* que es una de las plagas que más daño causa al cultivo por lo que disminuye su producción de azúcar.

*Metarhizium anisopliae*, anteriormente también conocido como *Entomophthora anisopliae*, es un hongo que causa la muscardina verde de los insectos. El nombre de la enfermedad se debe a conidias verdes que forma en la cutícula del insecto infectado. Las conidias son esporas asexuales que germinan y penetran al insecto por los espiráculos y poros de los órganos de los sentidos del insecto. El hongo invade los tejidos del insecto y lo mata apoyado por toxinas proteicas. En muchas ocasiones la cutícula del insecto muerto adquiere un color rojizo. En caso de que haya suficiente humedad en el ambiente el hongo forma un micelio blanco que cubre el insecto. Poco después el micelio empieza a producir las conidias verdes.

*Metarhizium anisopliae* se recomienda para el control de las siguientes plagas: *Aeneolamia varia*, *Prosapia reducta*, *Aeneolamia lepidor*, *Sphenophorus spp*, *Perkinsiella saccharicida*, *Diatraea spp*, *Aeneolamia albofasciata*.

El Ingenio san Antonio produce un hongo a manera comercial que es Bisa-01-Metarhisa este se obtuvo de una combinación de varias cepas originarias de Brasil, Costa rica, Venezuela y una nativa del Ingenio San Antonio. METARHISA es un insecticida microbiológico, a base del hongo *Metarhizium anisopliae*, para el control de las plagas insectiles en caña de azúcar, pastos, y otros cultivos. La cepa utilizada BISA 01 es el producto de varios años de estudios en campo y fue producida por parameiosis



de tres aislamientos altamente patogénicos y virulentos a las diferentes especies de cercópodos. (Roja S. 2009. Comunicación personal).

*Aeneolamia varia* como una plaga principal se reporta en los cultivos como la caña de azúcar y en pastos. (Lista oficial de plagas reportadas en Nicaragua, MAGFOR Managua 2004.)

Según estudios realizados por el departamento de control de plaga del Ingenio San Antonio, las ninfas de *Aeneolamia varia* chupan la savia de las raíces y los adultos la savia de las hojas, inyectando una toxina en la planta. Cuando el ataque del insecto es grave limita el crecimiento de la planta de *Saccharum officinarum* y es cuando ocurre pérdida en producción tanto en tonelada como en sacarosa (34%). Comunicación personal. (Lacayo R. 2010).

El propósito de realizar este trabajo de investigación es verificar las características toxicológicas de la cepa Bisa -01- Metarhisa tomando en cuenta su mortalidad y esporulación usando tres concentraciones  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml sobre ninfas de *Aeneolamia varia*, ya que esta es una de las causas de mayor daño en cuanto a la producción de plantas en el cultivo de caña de azúcar, lo cual viene a repercutir finalmente en la producción de tonelaje de plantas por manzanas.

## II. Objetivos.

### General:

Determinar la patogenicidad y esporulación de la cepa Bisa -01- *Metarhizium* de *Metarhizium anisopliae* en tres concentraciones que son:  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml sobre ninfas de salivita *Aeneolamia varia* en condiciones de laboratorio de hongos UNAN-León.

### Específicos:

- Evaluar cual de las tres concentraciones del hongo *Metarhizium anisopliae* es más patogénica sobre *Aeneolamia varia*.
- Evaluar cual de las tres concentraciones de hongo *Metarhizium anisopliae* presenta mayor esporulación sobre *Aeneolamia varia*.
- Seleccionar cual de las tres concentraciones del hongo *Metarhizium anisopliae* es más eficaz para el control de *Aeneolamia varia*.

### **III. Hipótesis.**

Ho. La Cepa Raza Bisa 01 *Metarhizium anisopliae* es patogénica para ninfas de *Aeneolamia varia*.

H1. La Cepa Raza Bisa 01 *Metarhizium anisopliae* no es patogénica a las ninfas de *Aeneolamia varia*.

## **IV. Marco Teórico.**

### **4.1 Origen de la caña de azúcar.**

La caña de azúcar es una planta proveniente del sureste de Asia, fue descubierta por los Árabes quienes la llevaron a la Península Ibérica, posteriormente los españoles llevaron la planta a las Islas Canarias y luego a las Indias Occidentales. ([http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharum\\_officinarum](http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharum_officinarum))

#### **4.1.1 Taxonomía de la caña de azúcar.**

Reino: Plantae.

División Magnoliophyta.

Clase: Liliopsida.

Orden: Poales.

Familia: Poaceae

Genero: Saccharum. <http://www.sian.info.ve>. (Gómez, 1983).

#### **4.1.2 Requerimiento Agroecológico de la caña de azúcar.**

La caña de azúcar es un cultivo de la zona sub-tropical, es una planta que tiene gran requerimiento de agua y asimila muy bien la radiación solar, teniendo una eficiencia cercana a 2% de conversión de la energía incidente en biomasa. Un cultivo eficiente puede producir 150 toneladas de caña por hectárea por año (con 14% de sacarosa, 14% de fibra y 2% de otros productos solubles).

La caña se propaga mediante la siembra de trozos de caña. De cada nudo sale una planta nueva idéntica a la original; una vez sembrada la planta crece y acumula azúcar en su tallo, el cual se corta cuando está maduro. La planta retoña varias veces y puede seguir siendo cosechada. Estos cortes sucesivos se llaman "zafras". La planta se deteriora con el tiempo, por el uso de las maquinarias que pisa las raíces, por estas razones debe ser replantada cada siete a diez años.

La caña requiere de abundante agua. Su período de crecimiento varía entre 11 y 17 meses, dependiendo de la variedad de caña y de la zona. Requiere de nitrógeno, potasio y elementos menores para su fertilización. En zonas salinas se adiciona azufre para controlar el sodio. ([http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharum\\_officinarum](http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharum_officinarum))

#### **4.1.3 Variedades de *Saccharum officinarum* susceptibles *Aeneolamia varia*.**

No existe un registro o antecedentes que digan que hay una variedad específica que es más susceptible a *Aeneolamia varia* si no que este insecto ataca de igual manera a cualquier variedad lo que hay que tener en cuenta son las condiciones ambientales entre mas humedad haya dentro de las parcelas de caña de azúcar mayor población de *Aeneolamia varia* habrá, como consecuencia mayor daño. (Comunicación personal, Lacayo R, 2010.)

La caña se puede cosechar a mano o a máquina. La cosecha manual se hace con personas, utilizando machetes que cortan los tallos (generalmente después de quemada la planta para hacer más eficiente la labor) y los organizan en chorras para su transporte. Una persona puede cosechar entre 5 y 7 toneladas por día de caña quemada y 40% menos de caña sin quemar. La cosecha mecánica se hace con cosechadoras que cortan la mata y separan los tallos de las hojas con ventiladores. Una máquina puede cosechar 30 toneladas por hora. Una vez cortada la caña debe transportarse rápidamente al ingenio para evitar su deterioro por levaduras y microbios. <http://www.sian.info.ve/> (Gómez, 1983).

## **4.2 Generalidades de *Aeneolamia*.**

La salivita (familia Cercopidae) también conocido como mosca pinta, baba de culebra o chinche salivosa comprende 11 géneros y aproximadamente 360 especies de cercópidos registrados en el neo trópico, de los cuales entre 20-30 son plagas de gramíneas. Los géneros principales son *Aeneolamia*, *Deois*, *Mahanarva*, *Prosapia* y *Zulia* <http://www.scielo.unal.edu.co/> (Peck, 2001).

### **4.2.1 Distribución geográfica y hospedante de *Aeneolamia*.**

La *Aeneolamia* es una plaga del continente Americano que tiene una amplia distribución geográfica que va desde el Sureste de los Estados Unidos de América hasta el Noreste de Argentina y una distribución altitudinal que va desde los 0 hasta los 3000 msnm <http://www.scielo.unal.edu.co/> (Peck, 2001; Rodríguez *et al.* 2003). Las especies de salivita de mayor importancia económica en las pasturas tropicales pertenecen a los géneros *Zulia*, *Deois*, *Prosapia*, *Aenolamia* y *Mahanarva*. En América Central se

encuentran los géneros de *Aeneolamia* y *Prosapia* (CIAT, 1982; Coto y Saunders, 2004).

La *Aeneolamia varia* es una plaga que se desarrolla en muchas especies de plantas. Se reportan daños serios en cultivo de caña de azúcar, maíz, arroz y numerosas poáceas silvestres, cultivadas como pastos para alimentar ganado. En los pastos cultivados los mayores daños se han reportado en: pasto barrera (*Brachiaria decumbens*), pasto guinea (*Panicum maximum*), pangola (*Digitaria decumbens*), alemán (*Echinochloa polystachya*), elefante (*Pennisetum purpureum*) y kikuyo, (*Pennisetum clandestinum*), entre otros.

En Guatemala existen las especies *Aeneolamia albofasciata* y *Prosapia simulans* que atacan a pastos, caña de azúcar, citronela, arroz, maíz y gramíneas silvestres (Saunders *et al.* 1998; Coto y Saunders, 2004).

#### **4.2.2 Taxonomía de *Aeneolamia*.**

Su Clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: Insecta

Orden: Homóptera

Sub. Orden: Auchenorrhyncha

Súper familia: Cicadoidea

Familia: Cercopidae

Géneros: *Aeneolamia*, *Deois*, *Mahanarva*, *Prosapia*, *Zulia*, etc. (www.sian.info.ve Guagliumi1957; 1962).

#### **4.2.3 Ciclo de vida de *Aeneolamia*.**

Los cercópodos presentan metamorfosis gradual o sencilla denominada paurometábola que se caracteriza por los estados de huevo, ninfa y adulto en el ciclo biológico de los insectos.

La diversidad taxonómica del complejo de la salivita implica también una variación biológica que se manifiesta principalmente en la duración de cada etapa del ciclo. El desafío para el manejo de este insecto es establecer los patrones poblacionales de cada especie en las diferentes regiones, lo que puede permitir tomar decisiones sobre estrategias de control más acertadas.

La figura 1 presenta los rangos de variación de las etapas del ciclo de vida de la salivita:

. Ciclo de vida de *Aeneolamia varia*.

Huevo de 10 a 20 días



Ninfas de 30 a 35 días.



Adultos de 15 a 20 días

Promedio ciclo de vida 65 días



#### 4.2.3.1 Huevo

Los huevos de *Aeneolamia varia* recién ovipositados presentan una coloración amarillo cremoso, no distinguiéndose ninguna estructura en especial, son alargados con una longitud promedio de 1 mm y 0.3 mm de diámetro, con superficie lisa <http://orton.catie.ac.cr/> (Vargas, 1970; CIAT, 1982). En huevos de *P. simulans* se observan cuatro fases de desarrollo (S1, S2, S3 y S4) y son distinguibles por su tamaño y apariencia externa, En la fase S1, los huevos son de color amarillo y sin evidencia de desarrollo. En la fase S2, hay una mancha roja localizada debajo de la línea de eclosión. En la fase S3, la línea de eclosión está abierta y la superficie negra del opérculo está expuesta. En la fase S4, hay un par de puntos rojos a los costados del corión, y otra pareja al lado de la línea de eclosión que representan los ojos. El tamaño de los huevos, tanto el ancho como el largo, se incrementan significativamente al pasar de una fase a otra y la duración promedio del estado de huevo es de 18 días [.http://orton.catie.ac.cr/](http://orton.catie.ac.cr/) (Rodríguez *et al* 2003). La humedad relativa influye notablemente en la duración del periodo de incubación; en condiciones de humedad del 80 ó 90% y temperatura de 26 °C los huevos incuban en un periodo de 15 días, con un rango de 12 a 18 días; en condiciones de baja humedad relativa el periodo de incubación puede prolongarse a 20 ó 30 días, y en ocasiones se inhibe la incubación y los huevos entran en diapausa, que puede durar varios meses, hasta que las condiciones sean favorables. La mayoría de los huevos ovipositados al final del periodo de lluvias permanecen en el suelo en estado de

diapausa hasta el inicio del siguiente periodo lluvioso, razón por la cual la primera generación de *Aeneolamia varia* generalmente coincide con el inicio de las lluvias. <http://orton.catie.ac.cr/> (CIAT, 1982).

#### 4.2.3.2 Ninfa

Las ninfas recién eclosionadas están desprovistas de zonas quitinizadas, son sumamente activas e inmediatamente buscan refugio en las partes húmedas y sombreadas de la base de las plantas e inician su alimentación, situándose generalmente en las raíces secundarias o tallos de la planta hospedera, generalmente la posición de alimentación es con la cabeza hacia abajo. Se caracterizan principalmente por la masa de espuma “saliva” que producen que sirve de defensa de enemigos naturales y como protección de condiciones climáticas adversas. La producción de espuma la llevan a cabo una vez que inician su alimentación, en el transcurso de 5 a 15 minutos, ya que en un tiempo mayor y condiciones adversas de temperatura y humedad, les causaría la muerte por desecación. <http://orton.catie.ac.cr/> (Bodegas, 1973). La espuma es formada por una sustancia de consistencia mucilaginosa que es secretada por glándulas hipodérmicas grandes, que están situadas a nivel de la región pleural del séptimo y octavo segmento abdominal y se denominan “glándulas de Batelli”. La sustancia que secretan está compuesta en su mayor parte de un amino azúcar y por el exceso de líquido que extraen de la planta <http://orton.catie.ac.cr/> (CIAT, 1982). En aproximadamente 10% de las espumas cohabitan ninfas que varía de 2 a 5 ocupantes y el diámetro de la espuma es de 3.5 cm en la especie *Prosapia nr. Bicincta* <http://orton.catie.ac.cr/> (Peck, 1998), mientras que Pass y Reed (1965) reportan que el 51% de las masas de espuma contienen 2 o más ninfas en la especie *varia*.

Durante el desarrollo de las ninfas se pueden identificar cinco instares o estadios <http://orton.catie.ac.cr/> CIAT, 1982; Al final de cada instar la ninfa sufre una muda y aumento de tamaño, desarrollando progresivamente las estructuras alares y reproductivas

En el primer estadio, recién eclosionada del huevo las ninfas son de color blanco o blanco cremoso, presentando los ojos de color rojo y unas manchas de color naranja-rojizo muy notorias, situadas, entre el 5o. y 8o. segmento abdominal <http://orton.catie.ac.cr/> (Bodegas, 1973; Peck, 2002). Sus alas son vestigiales y apenas distinguibles hasta poco antes de mudar por primera vez, sus patas se ven alargadas y son torpes al caminar <http://orton.catie.ac.cr/> (Coronado, 1978). Es muy difícil de encontrarlas en el campo por su tamaño pequeño y escasa masa de espuma y porque se



esconden en la superficie del suelo o entre la hojarasca, a veces en las fisuras debajo de la superficie del suelo.

En el segundo estadio las ninfas conservan su color inicial y las manchas rojo-anaranjadas son notorias. Sus alas vestigiales se distinguen al final del estadio cubriendo la mitad del primer segmento abdominal. Su cabeza oscurece un poco y la parte dorsal del tórax es también amarillo grisáceo.

Su abdomen es abultado como consecuencia de la alimentación y la masa espumosa que la protege, es también de mayor tamaño, según la cantidad de humedad existente en el medio en que se desarrolla <http://orton.catie.ac.cr/> (Bodegas, 1973; Coronado, 1978).

Durante el tercer estadio las ninfas tienen una tonalidad cremosa y el color de la cabeza y la parte dorsal del tórax es de tonalidad café-amarillenta o grisácea, contrastando con la coloración del cuerpo. Las alas son más desarrolladas, alcanzando la mitad del segundo segmento abdominal, son de color que varía de blanco-amarillento a café-amarillento. Las manchas rojo-anaranjadas del abdomen se observan más difusas y en ocasiones como grupos de manchas pequeñas <http://orton.catie.ac.cr/> (Bodegas, 1973).

En el cuarto estadio, las ninfas no muestran cambios apreciables respecto del tercer estadio, lo que destaca es el aumento de tamaño del cuerpo <http://orton.catie.ac.cr/> (Bodegas, 1973).

El quinto estadio es una etapa de transición entre el estado ninfal y el adulto. La ninfa deja de secretar la saliva y completa la formación de sus alas, y aunque inicialmente se observan descoloridas, éstas cambian su coloración a través del tiempo. Se distinguen dos fases en este estadio, el temprano (Va) y el tardío (Vb). La diferencia entre estas dos fases es la longitud del cuerpo y no se consideran como instares distintos, porque no ocurre muda del insecto. En el último instar la espuma que recubre a la ninfa es más denso y persiste varios días hasta que ocurre la última muda y emerge el adulto.

La duración de la fase ninfal depende de la especie de salivazo y de las condiciones ambientales, observándose que bajo condiciones de invernadero con temperatura de 26 °C y humedad relativa de 80-90%, las ninfas de *Zulia colombiana* desarrollan en un promedio de 45 días con un rango de 34 a 57 días. <http://orton.catie.ac.cr/> (CIAT, 1982).

#### **4.2.3.3 Adulto**

El adulto presenta inicialmente un color blanco y permanece inmóvil durante varias horas dentro de la masa espumosa. Al contacto con el aire, el cuerpo y las alas van adquiriendo lentamente su coloración normal por oxidación de sus pigmentos <http://orton.catie.ac.cr/> (CIAT, 1982)

El macho de *Aeneolamia varia* mide de 7 a 8 mm de largo y la hembra es ligeramente más grande, sus dimensiones son de 8 a 9 mm de largo y de 5 a 6 mm de ancho. El cuerpo tiene una forma oval, la cabeza es de color oscuro o negro brillante, tiene ojos simples (ocelos) muy cercanos uno del otro, aparte de los ojos compuestos que se encuentran desarrollados. Las antenas están formadas por tres segmentos, el último es muy corto y está provisto de dos cerdas. Las alas anteriores (superiores o primer par de alas) son más gruesas que las inferiores, tienen color café oscuro y en algunas especies las atraviesan dos bandas transversales de color amarillo claro, las alas inferiores son de consistencia membranosa. Las patas son de color oscuro, el abdomen está formado por nueve segmentos visibles, los dos primeros se encuentran reducidos. El tiempo promedio de vida del adulto es variable dependiendo de la especie; para *Prosapia simulans* el promedio es de 16.5 días y la duración por sexo es de 15.3 días para machos y 17.9 días para las hembras <http://orton.catie.ac.cr/>(Rodríguez *et. al.* 2003).

#### **4.2.4 Reproducción y sitios de ovoposición de *Aeneolamia***

Bajo condiciones de laboratorio se observó que las hembras una vez emergidas de la masa de espuma están receptivas a la copulación. En las primeras 72 horas copularon hasta tres veces con un promedio de 1.4 veces <http://orton.catie.ac.cr/>(Peck *et al.* 2003).

El número de huevos que una hembra puede ovipositar es variable y se cuenta con reportes de 22 hasta 300 huevos. Los huevos son de dos tipos: diapáusicos y no diapáusicos. La mayor parte de los huevos diapáusicos son depositados en los primeros 2 cm del suelo, permaneciendo en este estado durante todo el período de sequía hasta el inicio de las lluvias. En ese momento, los huevos en estado de diapausa o “hibernación”, eclosionan y aparecen las primeras ninfas, que después de cinco mudas dan origen al insecto adulto, el cual emerge del interior de la baba. Los huevos no diapáusicos emergen poco tiempo después de la ovoposición (10 a 20 días).

En zonas en donde el régimen de lluvias es intenso (2500 mm/año o más), pueden presentarse hasta cinco generaciones del insecto por año, las cuales pueden traslaparse, haciendo más complicado su control.

Los huevos son ovipositados cerca o entre las raíces de los pastos, enterrados a 1 ó 2 cm de profundidad, también pueden ser ovipositados sobre la superficie del suelo o sobre los estolones y residuos vegetales que se encuentran en contacto con el suelo. Cuando la hembra entierra los huevos, los ovipositaran con el polo anterior hacia arriba para facilitar la salida de la ninfa. Las hembras pueden penetrar en las grietas y ovipositar a mayor profundidad (CIAT, 1982). En estudios realizados con *Aeneolamia reducta* y *A. lepidior* se encontró que aproximadamente el 90.4% de los huevos fueron ovipositados en el suelo, 8.2% en hojarasca y 1.4% sobre lámina foliar <http://orton.catie.ac.cr/> (Peck *et al.* 2003).

#### **4.2.5 Patrones de comportamiento y distribución espacial del *Aeneolamia*.**

Las ninfas de *Aeneolamia* permanecen estáticas y cubiertas por la espuma que forman en las raíces y en los tallos de las plantas. Los adultos tienen vida libre y buena capacidad de movilidad, son malos voladores y se desplazan principalmente mediante saltos; no se tiene reportes de que recorran grandes distancias, pero se estima que pueden recorrer hasta 140 m durante su vida adulta <http://orton.catie.ac.cr/> (Coronado, 1978); su mecanismo de defensa es la habilidad de saltar, apoyados por el aposematismo y un mecanismo de defensa denominado auto hemorragia <http://orton.catie.ac.cr/> (Peck, 2001; Rodríguez *et al.* 2003).

La dinámica poblacional del salivazo está influenciada principalmente por condiciones climáticas.

Los primeros insectos aparecen pocos días después del inicio de las lluvias y se prolongan durante todo el periodo lluvioso, apareciendo picos de ninfas y adultos de manera escalonada y superpuestas; se pueden presentar muchas generaciones por año si existen condiciones de mucha humedad en el suelo, o cuando existe mal drenaje. La humedad es un factor que favorece a la plaga. [www.sian.info.ve](http://www.sian.info.ve). (Vargas, 1970).

### **4.3 Control Microbial**

Es la utilización de microorganismos entomopatógenos o sus productos que sirven para disminuir las densidades poblacionales de insectos plagas dentro de estos microorganismos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos (Alves 1986).

Uno de los grupos más estudiados a nivel mundial en diferentes plagas y cultivos han sido los hongos entomopatógenos. Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen como agente causal un hongo. Dentro de los principales hongos entomopatógenos tenemos los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Hirsutella*, *Nomureae* (Alves 1986, Rosas 2000).

#### **4.3.1 Hongo *Metarhizium anisopliae*.**

*Metarhizium anisopliae* es el agente causal de la muscardina verde y es un patógeno de más de 300 especies de siete ordenes de insectos. Los coleópteros son los hospederos más comunes. Es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado para el control microbial y es el hongo más usado en Latinoamérica para el control de muchas especies de cercópodos que son plagas en la caña de azúcar. (Carballo M, Guharay F 2004.)

*Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokim:

Pertenece a la clase Deuteromicetos, es un patógeno de gran número de plagas, insectiles, se le conoce como el agente causal de la muscardina verde en las cigarras de los géneros *Deois* y *Zulia* plaga de gran importancia en el Brasil, desde entonces es considerado candidato importante en el control microbiológico (Alves1986).

#### **4.3.2 Morfología**

Visto al microscopio presenta células conidiogena (Fialidas) de forma cilíndrica con ápices redondeados o cónicos y están arreglados en densos himenios. Los conidióforos son ramificados y repetidamente formando una estructura semejante a un candelabro. Los conidios son aseptados, cilíndricos u ovoides, formando cadenas usualmente arregladas en columnas prismáticas o cilíndricas o en masas sólidas de cadenas paralelas, verde de pálido a brillante a verde - amarillo, u oliváceo. *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* presenta conidios cortos de 3.5 a 9 um mientras que *Metarhizium anisopliae* var. *Mayor* presenta conidios de 9 a 18 um. Los cadáveres de los insectos afectados, se observan completamente cubiertos con micelio del hongo de

color blanco. Cuando el hongo esporula sobre el cadáver, adquiere una coloración verdosa. (Carballo M, y Guharay F 2004.)

### **4.3.3 Taxonomía:**

Reino: Mycete.

División: Amustigomicotin.

Sub división: Deuteromycitina

Clase: Deuteromicetes.

Sub clase: Hypomicetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Genero: *Metarhizium*.

Especie: *Anisopliae*.

(Alexopoulos y mims 1979, Mc coy etal 1988, samson1998 citado por gallegos et. al 2003.)

### **4.3.4 Patogenicidad y virulencia.**

Patogenicidad es la capacidad de un organismo en provocar una enfermedad. Es un atributo cualitativo, es decir microorganismo puede o no ser patogénico. Otro término muy utilizado es la virulencia y este se refiere a la intensidad o grado de las enfermedades, este es permanente es relativo y tiene que ser comparado con otras cepas sobre el mismo hospedero.

La virulencia es expresada como porcentaje de mortalidad en dosis letal cincuenta DL 50 o concentración letal CL 50. (Nelson 1977 citado por Leoucona 1995).

### **4.3.5 Ciclo de vida *Metarhizium anisopliae*.**

El ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae* comprende una fase patogénica con la unión de los conidio del hongo a las partes frágiles de la cutícula del insecto. Una alta humedad es un requisito importante el microclima de la cutícula del insecto. Si estas condiciones son adecuadas, ocurre la germinación de los conidios originando un tubo germinativo y luego se forma la estaquilla de penetración para penetrar la cutícula. Varias enzimas participan en la invasión de la cutícula del insecto marca el fin de la fase patogénica y el micelio empieza a crecer saprofiticamente dentro del hemocelo invadiendo todos los tejidos. La muerte del hospedero ocurre tanto por el efecto

mecánico del hongo como por el efecto de los metabólicos tóxicos producidos. Después de la muerte ocurre una fase de crecimiento micelial hacia el exterior que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie y rodeando el cadáver del insecto. (Rosas, 2000).

#### **4.3.6 Modo de acción de *Metarhizium anisopliae*.**

En cuanto el mecanismo específico de acción los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto. Cuando el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo provocándole la muerte por micosis. Además la mayoría de estos hongos producen sustancias líticas y toxinas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa de los insectos aun cuando muchas de estas toxinas se producen solo el interior del insecto. Se ha demostrado que muchas especies de hongo pueden producir durante su reproducción metabolitos bioactivos con efectos insecticidas, lo que potencia su acción.

Las etapas en el desarrollo de una micosis pueden simplificarse en las siguientes etapas.

**4.3.6.1 Germinación de las conidias:** una excelente germinación ocurre en 12 horas con temperatura de 23-30°C y una humedad relativa de un 80%; requiriendo de fuentes de nitrógeno, carbono, y energía para la formación de tubo germinativo. La habilidad del hongo para utilizar estos elementos está en función de su agresividad, virulencia, cantidad de esporas (requeridas para matarlos), tiempo de germinación y penetración después de la adhesión de la cutícula del hospedero. (Clark, 1986 y Smith y Grula, Legar, 1981 Citado por Rosas, 2000).

**4.3.6.2 Formación de apresorio:** En la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura

**4.3.6.3 Penetración:** El crecimiento superficial de los hongos entomopatógenos, previos a la penetración de la cutícula es variable, generalmente ocurre en 24 horas, la naturaleza del estímulo o estímulos que causan la orientación del tubo germinativo de las esporas a través de la cutícula, indican alguna forma de reconocimiento químico como prerequisite para la penetración. La penetración está dividida en dos procesos principales; 1) Físico: es cuando las hifas rompen áreas membranosas o esclerosadas y 2) Químico: es cuando el hongo produce enzimas como las proteasas, lipasas y quitinasas que facilitan penetración mecánica.

Alrededor del área de penetración aparecen síntomas de histólisis (descomposición de los tejidos por la acción de enzimas). El aparato bucal, ano y regiones ínter segmentales son probablemente las áreas más comunes de penetración.

**4.3.6.4 Colonización:** A partir de la penetración inicia un proceso de colonización del hospedero, de ese momento son formadas pequeñas colonias de cuerpos hifales que se van engrosando y ramificando, la colonización inicia en el hemocelo del insecto y luego pasa al resto del cuerpo como: los cuerpos grasos; sistema digestivo, tubo de malpighi, sistema nervioso, músculos y traqueas. El tiempo de colonización podría variar entre 76 -120 horas dependiendo del patógeno, del insecto y las condiciones ambientales.

**4.3.6.5 Reproducción del patógeno:** Después de 4 a 5 días de muerto el insecto comienza a emerger de hifas por los espiráculos y regiones inter segmentales y después de 24 o 48 horas la emergencia de las hifas se inician la formación de conidias, esto se logra dependiendo del patógeno temperatura humedad y radiación ultra violeta. (Alves, 1986).

### **4.3.7 Toxinas**

*Metarhizium anisopliae* produce varias toxinas entre ellas los ciclodepsipeptidos como las dextruxinas A, B, C, D y las desmetidextruxina B y otras como A1, A2, B1, C2, D1, D2 y E1. Son compuestos tóxicos que varían con la especie de insecto. Otros son las cytochalasinas que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad en insectos afectados por *Metarhizium*. (Uso de control biológico. UNA.Managua, 2002)

### **4.3.8 Modo de entrada**

Además de la acción física del micelio producida por la multiplicación del hongo en el interior del cuerpo del insecto que invade los órganos y tejido, es muy importante la participación de las Dextruxinas que tiene acción insecticida propia. El hospedero produce reacción de defensa celular por ejemplo granulomas que son tejidos formados para rodear el micelio. Las toxinas producidas por el hongo erosionan estos granulomas y permiten a las blastosporas invadir el hemocelo. Las toxinas también matan al hospedero al provocar una degradación progresiva de sus tejidos debido a la pérdida de

integridad estructural de las membranas y la consecuente deshidratación de las células por pérdida de fluidos.

#### **4.3.9 Sintomatología**

Los insectos enfermos presentan cambios de conducta, entre ellos cese de la alimentación, pérdida de coordinación, movilización a partes altas de la planta en que se encuentran o movilizan hacia la superficie del suelo en caso de insectos del suelo y síntomas como cambio de coloración del tegumento o manchas en la piel. (Uso de control biológico. UNA.Managua, 2002)

#### **4.3.10 Toxicidad para otros organismos**

Este hongo no tiene efecto sobre organismos como vertebrados y sobre la salud humana. No se ha encontrado efectos negativos del hongo sobre las abejas en el campo.

#### **4.3.11 Ventaja de hongo entomopatógenos.**

Los agentes microbiológicos, en particular los hongos entomopatógenos, ofrecen varias ventajas en el control de plagas: bajos costos de producción, bajo impacto ambiental, en particular no tiene efectos secundarios sobre organismos acuáticos y animales de sangre caliente, son más selectivos que los productos químicos, adecuada para utilizarse en áreas de producción orgánica y en áreas protegidas, la eliminación de residuos es relativamente fácil basta con exponer el producto un par de día en el sol para que el producto se inactive casi totalmente (Barrientos,2002).

#### **4.3.12 Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos.**

Algunos hongos entomopatógenos son bastante específicos, diversos estudios sobre efectos secundarios han indicado que no se pone en riesgo a organismos acuáticos, poco o ningún impacto sobre artrópodos terrestres y no afectan vertebrados o animales, de sangre caliente (aunque se recomienda utilizar equipos de protección adecuado y no inhalar las esporas).

#### **4.3.13 Uso actual y futuro de entomopatógeno.**

La tecnología para formular y aplicar hongos entomopatógenos en forma eficiente y efectiva ha sido desarrollada. Sin embargo, esta tecnología necesita ser transferida y que sea efectiva a países en desarrollo, donde los costos económicos y ambientales por la aplicación de productos químicos son extraordinarios, países como México y Brasil están tratando de desarrollar su propia tecnología para el uso de hongo entomopatógeno



en el control de plagas usando aislamiento nativo y evitando la introducción de cepas exóticas.

Las autoridades responsables de la sanidad vegetal en países en desarrollo deben propiciar la transferencia de tecnología, lo cual permitirá que extensionista como productores y técnicos de campo que se familiaricen con el uso, de aplicaciones y bondades de productos biológicos, sobre todo como un elemento importante en programas de Manejo Integrado.

Otro aspecto importante a considerar para lograr el éxito de hongos entomopatógenos es el estudio del comportamiento, actividad diaria y capacidad termo regulatoria de las especies plagas, muchas de ellas pueden inactivar el efecto de entomopatógeno (Barrientos, 2002).

## V Material y Método.

El trabajo se realizó, en el laboratorio de hongo entomopatógeno del CIRCB en el Campus Agropecuario de la UNAN- LEON ubicado a 1 Km y 1/2 al este carretera a la Ceiba en la ciudad de León.

El laboratorio de hongo entomopatógeno donde se realizó el bioensayo cuenta con las siguientes condiciones ambientales controladas, temperatura 27° C, humedad relativa en un rango de 75 a 80%.

### Bioensayo

#### 5.1 Colección de insectos

Para realizar el experimento se prosiguió a la recolección de la ninfa *Aeneolamia varia*. La colecta se realizó en la parcela el Ayote ubicada en el Ingenio San Antonio municipio de Chichigalpa, con un área de 10 mz de *Saccharum officinarum* variedad mexicana, teniendo ubicada el área se escogieron 10 puntos los cuales se eligieron al azar, cada punto media un 1m lineal. La toma de las ninfas también fue al azar tomando 30 ninfas con una edad de 10 a 15 días después de emergidas del huevo por cada punto, estas se encontraban en el suelo a orilla del tallo de la planta de caña de azúcar su recolección fue manual tomándolas y depositándolas en cajas de cartón de 30cm de largo, 20cm de ancho y 10cm de altura. Recolectadas las ninfas se llevaron al laboratorio para desinfectar con agua e hipoclorito de sodio al 2% y ponerlas en plato petri.

**5.2 Desinfección del alimento:** El alimento consistía en raíces y tallos picados de caña de azúcar variedad mexicana los cuales fueron lavados con agua y luego sumergidos en hipoclorito de sodio al 2%.

**5.2.1 Preparación de la suspensión fungosa:** Del hongo *Metarhizium anisopliae* tomamos 4 gramos de conidias y se colocaron en un frasco con 260 ml de agua estéril, luego se agitó hasta obtener una suspensión fungosa homogénea, solución madre ( $10^{10}$  conidias/ml) de donde se derivaron las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml para la evaluación del bioensayo en el laboratorio de hongo entomopatógeno del CIRCB en el Campus Agropecuario de la UNAN- LEON.

**5.2.2 Medición de la concentración de la suspensión fungosa:** Para los bioensayos se utilizó una suspensión fungosa con concentración de  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml. Para asegurar tener esta concentración se realizó un conteo de conidias utilizando la cámara de Neubaver ocupando el campo más pequeño de la cámara y utilizando la fórmula propuesta por Alves (1986) se logro conocer la concentración total de la suspensión.

$$X * 25 * 4 * 10^6$$

X = Promedio de conidias de las repeticiones.

25 = Numero de cuadros totales.

$4 * 10^6$  = Constante de cuadrados pequeños diámetro, profundidad, volumen. (Alves 1986).

100 ml = Factor de dilución.

### **5.2.3 Conversión de concentraciones.**

Para hacer una dilución en serie o pasar de cualquier concentración que se tenga a otra concentración se emplea la fórmula propuesta por Leoucona. R en 1995

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

C1=Concentración inicial.

C2=Concentración final.

V1=Volumen inicial.

V2=Volumen final.

### **5.2.4. Prueba de viabilidad:**

Con un gotero se colocaron 5 gotas de la suspensión del hongo sobre el medio de cultivo P.D.A (Papa 200 g, dextrosa 20 g, agar 20 g) en los platos petri, se colocaron en cámara húmeda por 24 horas, después se cuenta el número de conidias germinadas y no germinadas.

Se observaron de 5 a 10 campos de visión del microscopio a 40x de manera que si se llega a contabilizar un mínimo de 200 conidias en total, mediante una regla de tres se obtiene el porcentaje de conidias germinadas a partir del número total de conidias observadas y el número total de conidias germinadas.

### **5.3 Montaje del Bioensayo.**

La metodología empleada en el bioensayo fue del libro Curso internacional de patología de insecto por Rosas J. 2000.

El método de utilización del bioensayos es de inmersión de las ninfas *Aeneolamia varia* en la suspensión de conidias, durante 2-3 segundos, luego para quitar el excedente de la suspensión sobre los cuerpos se colocaron en papel toalla. Por cada concentración se utilizó 75 ninfas *Aeneolamia varia* con edades de 10 a 15 días después de emergidas del huevo, depositándolas en 15 platos petri, 5 *Aeneolamia varia* por plato petri, lo cual se dividió en tres repeticiones (5 platos petri por repetición) para un total de 225 ninfas *Aeneolamia varia* en los bioensayos.

Se realizaron 3 diluciones sobre los estados ninfales con edades de 10 a 15 días después de emergidas del huevo, siendo  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml.

#### **5.3.1 Lectura del Bioensayo.**

La lectura de mortalidad sobre los insectos de *Aeneolamia varia* se realizó a partir del 4 de noviembre del 2008 que fue el primer día, se hizo el conteo de observación contabilizando cada dos días hasta el día 12 de noviembre del 2008 después de la inoculación de los insectos, se contabilizaron los insectos vivos y los muertos.

#### **5.3.2 Medición de la esporulación.**

Los insectos muertos se montaron en cámara húmeda, donde se mantuvieron hasta la muerte de los últimos insectos con el objeto de proporcionar al hongo las condiciones óptimas de 27°C y una humedad relativa de 75-80% para que esporule. Cuando el hongo logra esporular las conidias de *Metarhizium anisopliae* son verde oscuro y más secas.

Las cámara húmeda consiste en un plato petri ya sea plástico o de vidrio al cual se le depositó un papel toalla al que se le humedecía con un gotero dejando caer de 2 a 3 gotas de agua esterilizada para mantener un ambiente óptimo para la esporulación. Luego se colocaron los insectos muertos y se sellaron los platos petri para mantener el ambiente similar al del bioensayo, este se revisaba cada dos días con el fin de conocer los insectos muertos por efecto del hongo *Metarhizium anisopliae*, si encontrábamos insectos esporulados mayor del 20%, el hongo es eficaz según Alves, 1986.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **6.1 Medición de la concentración de la suspensión fungosa.**

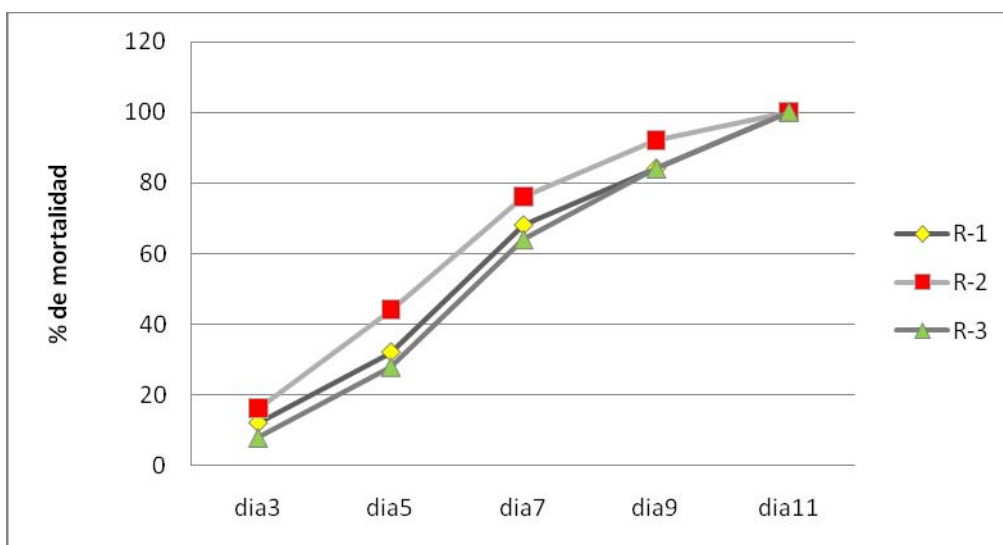
El resultado del conteo de conidias del hongo *Metharizium anisopliae* fue:  $1 \times 10^{10}$  conidias / ml

### **6.2 Prueba de viabilidad**

El resultado obtenido en la prueba de germinación a las 24 horas sobre el medio de cultivo P.D.A fue de 90% lo que nos indica que hay un buen porcentaje de viabilidad del hongo Bisa -01- Metarhisa. Bajo condiciones de laboratorio con una temperatura de 27°C y humedad relativa entre 70 y 80% en el laboratorio de hongo entomopatógeno del CIRCB en el Campus Agropecuario de la UNAN- LEON.

### 6.3 Porcentaje de mortalidad del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* en concentración $10^8$

En el gráfico 1 se observa claramente que la concentración de  $10^8$  conidias/ml inicia la mortalidad de los insectos, al tercer día después de infectados, la repetición-1 obtuvo una mortalidad del 12%, la repetición-2 un 16% y la repetición-3 un 8%, aumentando gradualmente hasta alcanzar el séptimo día la repetición-1 un 68%, la repetición-2 un 76% y la repetición-3 64%. El día 11 alcanza la mayor mortalidad llegando a obtener, la repetición-1 100%, la repetición-2 100% y la repetición-3 100%.

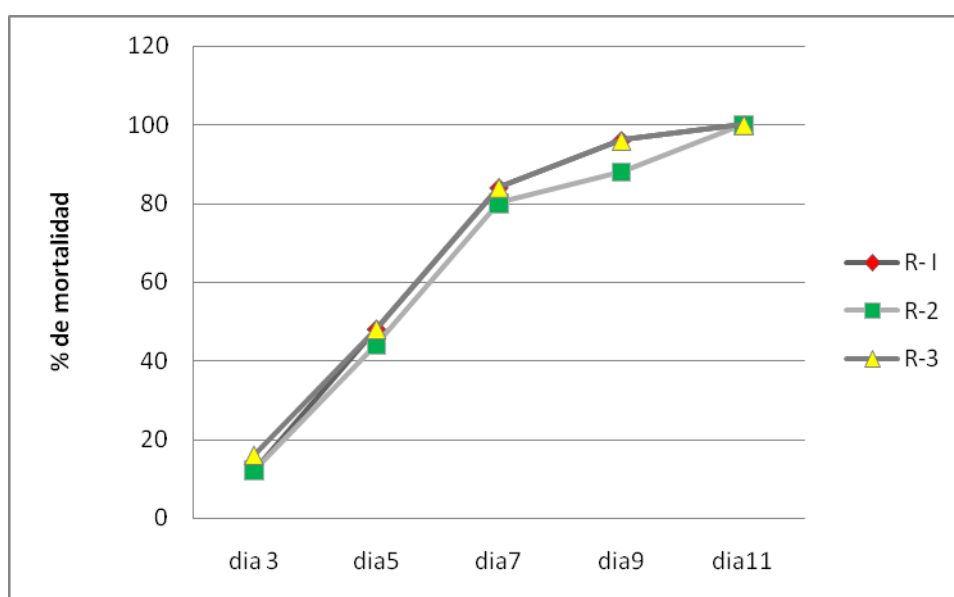


Días después de infestados.

Gráfico N° 1. Mortalidad de *Aeneolamia varia* utilizando la concentración  $10^8$  conidias/ml del hongo *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.

#### 6.4 Porcentaje de mortalidad del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* en concentración $10^9$ .

En el gráfico 2 se observa claramente que la concentración  $10^9$  conidias/ml inicia la mortalidad de los insectos al tercer día después de infestados donde la repetición-1 obtiene una mortalidad del 12%, la repetición-2 un 12% y la repetición-3 un 16% aumentando gradualmente hasta alcanzar en el séptimo día la repetición-1 un 84%, la repetición-2 un 80% y la repetición-3 84%. El día 11 alcanza su mayor mortalidad llegando a obtener, la repetición-1 100%, la repetición-2 100% y la repetición-3 100%.

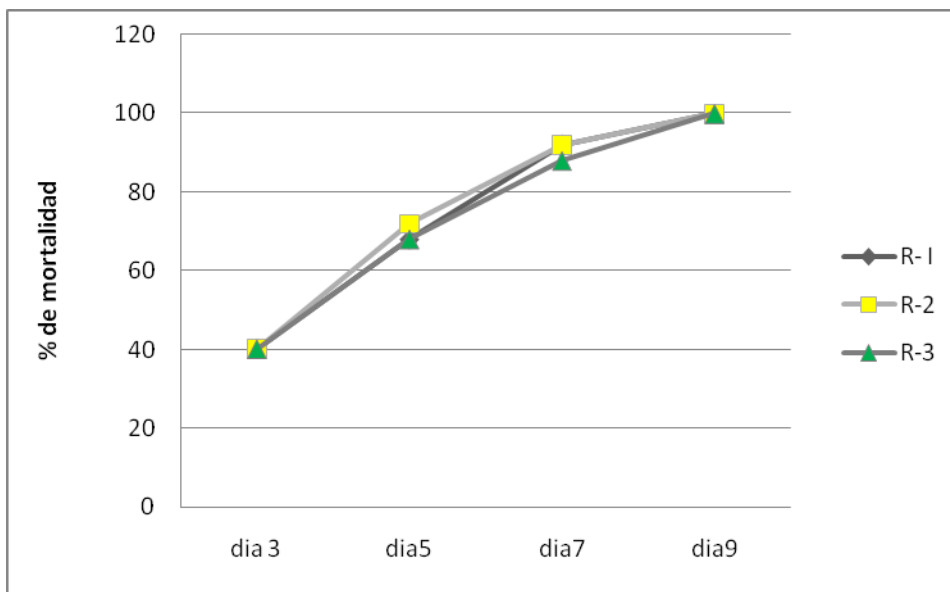


Días después de infestados.

Gráfico N° 2. Mortalidad de *Aeneolamia varia* utilizando la concentración  $10^9$  conidias/ml del hongo *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.

### 6.5 Porcentaje de mortalidad del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* en concentración $10^{10}$ conidias/ml.

En el gráfico 3 se observa que la concentración  $10^{10}$  conidias/ml inicia la mortalidad de los insectos al tercer día después de infestados donde la repetición-1 obtiene una mortalidad del 40%, la repetición-2 un 40% y la repetición-3 un 40% aumentando gradualmente hasta alcanzar en su séptimo día la repetición-1 un 92%, la repetición-2 un 92% y la repetición-3 88%. El día 9 alcanza la mayor mortalidad llegando a obtener, la repetición-1 100%, la repetición-2 100% y la repetición-3 100%.



Días después de infestados.

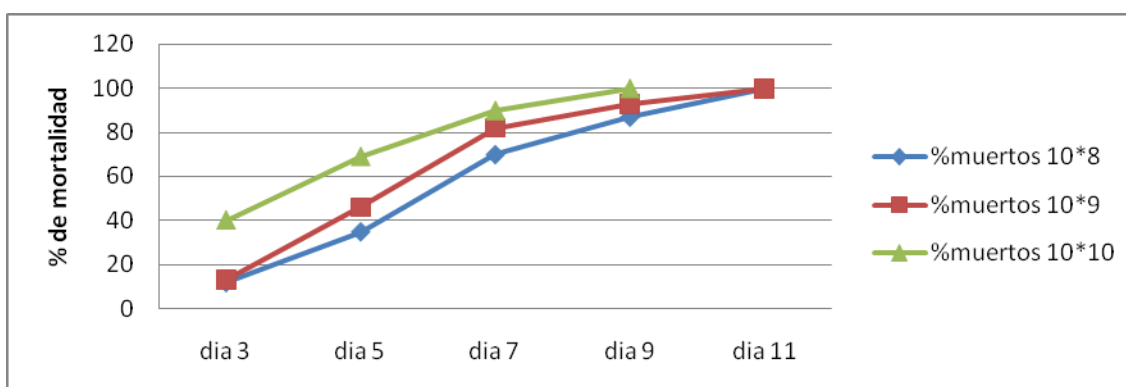
Gráfico N° 3. Mortalidad de *Aeneolamia varia* utilizando la concentración  $10^{10}$  conidias/ml del hongo Bisa -01- *Metarhiza* de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.



### 6.6 Porcentaje de mortalidad del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* en tres concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml

En el gráfico 4 se observa claramente el comportamiento de mortalidades de las concentraciones  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml en el tiempo, representadas por las distintas concentraciones. El porcentaje de mortalidad se obtuvo de la suma de números de insectos muertos por día multiplicados “por” 100% “entre” la población total de *Aeneolamia varia*. Donde la mortalidad inicia el tercer día después de infestados los insectos por el hongo *Metarhizium anisopliae*, donde la concentración  $10^{10}$  conidias/ml, obtuvo un 40% de mortalidad en cuanto las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml tuvieron 13% y 12%, el séptimo día la mortalidad de la concentración  $10^{10}$  conidias/ml, fue de 90% y la de  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml fue de 82% y 70%. En el noveno día la concentración  $10^{10}$  obtiene un 100%, mientras que las otras dos concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml fue de 93% y 87% de mortalidad. Se logra observar que la concentración  $10^{10}$  conidias/ml tuvo su 100% de mortalidad al noveno día, mientras que las otras dos concentraciones llegaron hasta el día 11 obteniendo  $10^9$  conidias/ml 100% de mortalidad y  $10^8$  conidias/ml 100% de mortalidad de los insectos.

Si bien es evidente que la concentración  $10^{10}$  conidias/ml reduce las poblaciones *Aeneolamia varia* arriba de 50% en su segundo día y las otras dos concentraciones lo realizan en su tercer día, pero podemos observar que las tres concentraciones tienen casi el mismo comportamiento, su diferencia es en días.



Días después de infestados

Gráfico N° 4. Mortalidad de *Aeneolamia varia* utilizando la concentración  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml del hongo *Bisa -01- Metarhiza* de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.

### 6.7 Porcentaje de esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* en tres concentraciones $10^{10}$ conidias/ml, $10^9$ conidias/ml y $10^8$ conidias/ml.

En la gráfica 5 se observa el comportamiento de la esporulación de las concentraciones  $10^8$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^{10}$  conidias/ml donde todas presentaron valores altos de insectos esporulados. Las tres concentraciones presentaron valores de esporulación mayor al 20%, cuando existe una esporulación mayor al 20% se considera que el hongo es eficaz (Alves, 1986). Aunque la concentración  $10^{10}$  conidias/ml fue la más alta con 56% teniendo esta un mayor número de insectos esporulados, después la  $10^9$  conidias/ml con 30.6% y la más baja fue  $10^8$  conidias/ml con 21.3% de esporulación.

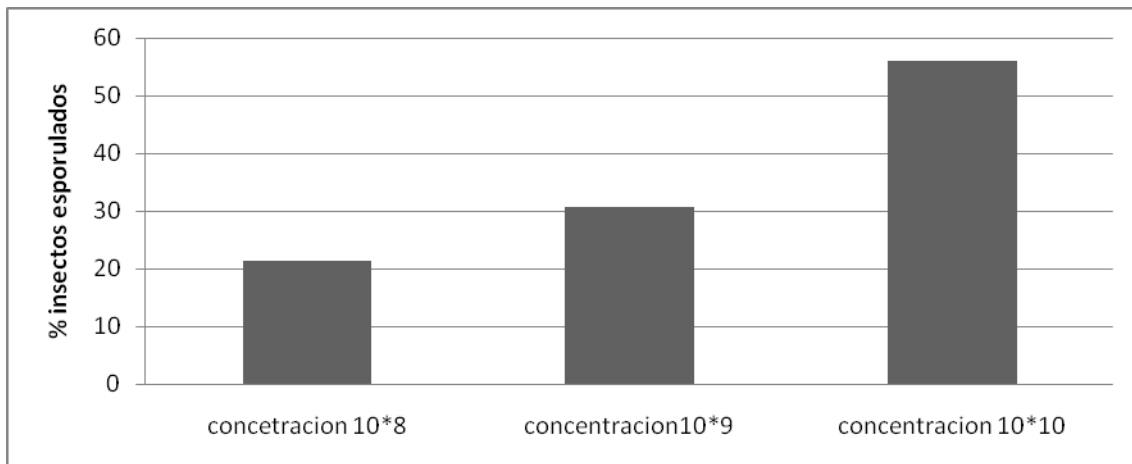


Gráfico 5. Esporulación de *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de *Aeneolamia varia* Utilizando la concentración  $10^8$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^{10}$  conidias/ml del hongo Bisa -01- *Metarhiza* de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio UNAN-LEON 2008.

## 6.8 Comparación porcentual de la mortalidad y esporulación de las concentraciones

En la tabla N° 1 donde se compara las tres concentraciones se observa que la concentración  $10^{10}$  conidias/ml obtuvo un 100% de mortalidad al noveno día. Las otras dos concentraciones obtuvieron,  $10^9$  conidias/ml un 100% y  $10^8$  conidias/ml un 100% de mortalidad pero estas lo realizan el día 11. Por lo tanto, la concentración  $10^{10}$  conidias/ml su mortalidad fue en 9 días y las de las otras dos concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml fueron en 11 días por lo tanto mientras más altas sean las concentraciones del hongo *Bisa-01-Metarhisa* va existir una mayor mortalidad de *Aeneolamia varia* sobre el tiempo, y el ciclo de vida va ser más corto.

La concentración  $10^{10}$  presentó el mayor porcentaje de esporulación con 56% mientras que  $10^8$  conidias/ml obtuvo 21.3% y  $10^9$  conidias/ml un 30.6%. El tiempo de esporulación para  $10^{10}$  conidias/ml fue de 6 días,  $10^9$  conidias/ml fue de 7 días y  $10^8$  conidias/ml de 6 días.

**Tabla N°1. Comparación de mortalidad y esporulación de las concentraciones  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio con temperatura de 27° C y humedad relativa entre 70% y 80% UNAN-LEON 2008.**

Concentración	Tiempo de mortalidad.	%Mortalidad	Tiempo de esporulación.	%Esporulación
Concentración $10^8$	11 días	100%	6 días	21.3%
Concentración $10^9$	11 días	100%	7 días	30.6%
Concentración $10^{10}$	9 días	100%	6 días	56%

## VII.-Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la UNAN-León concluimos que:

1. Las tres concentraciones utilizadas  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml de BISA -01- Metarhiza de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* son eficaces presentando un porcentaje de mortalidad del 100% en condiciones de laboratorio.
2. La concentración que mayor esporulación presentó fue la concentración  $10^{10}$  conidias/ml obteniendo una esporulación de 56% en los insectos muertos de *Aeneolamia varia*.
3. La concentración  $10^{10}$  conidias/ml, de *Metarhizium anisopliae* fue la más eficaz obteniendo un 100% de mortalidad en 9 días, y un 56% de esporulación sobre *Aeneolamia varia*, recalcando que las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml obtuvieron 30.6% y 21.3% de esporulación.
4. La cepa BISA -01- Metarhiza utilizada en el bioensayo en el laboratorio de hongos entomopatógenos UNAN-León, es eficaz sobre *Aeneolamia varia* porque presentó un porcentaje de mortalidad del 100% en las tres concentraciones  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml y un porcentaje de esporulación de 21.3%, cuando existe una esporulación mayor al 20% se considera que el hongo es eficaz según Alves, 1986.

## VIII.-Recomendaciones

Con los resultados obtenidos después de haber realizados las pruebas en el laboratorio para determinar cual de las concentraciones  $10^{10}$  conidias/ml,  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml, del hongo Bisa- 01-metharisa de *Metarhizium anisopliae* es más patogénico en *Aeneolamia varia* en el laboratorio. Recomendamos:

1. La utilización de la cepa Bisa -01- Metarhisa de concentración  $10^{10}$  conidias/ml en *Aeneolamia varia* porque presentó el 100% de mortalidad a los 9 días, las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml 100% de mortalidad en 11 días.
2. La utilización de la concentración  $10^{10}$  conidias/ml de *Metarhizium anisopliae* sobre *Aeneolamia varia* porque obtuvo 56% de esporulación, las concentraciones  $10^9$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml 30.6% y 21.3% de esporulación.
3. Realizar otro estudio con concentraciones mas distanciadas bajo condiciones controladas de laboratorio en la UNAN-León.

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alves, S. B. 1986. Control Microbiano de insectos. Editora, Manole, Ltda. 99-104 pp.
2. Barrientos L. uso de hongos Entomopatógenos en el control de plagas en campo; comercialización, uso actual y futuro de hongos Entomopatógenos, Curso de Patología de Insectos, Ciudad de Victoria Tamaulipas, México, 2002.
3. Bodegas 1973. Estado ninfal de *Aeneolamia*. <http://www.orton.catie.ac.cr>
4. Bodegas, 1973; Coronado, 1978. Estado ninfal de *Aenolamia*.  
[www.ortoncatie.ac.cr](http://www.ortoncatie.ac.cr)
5. Bodegas, 1973; Peck, 2002. Estado ninfal de *Aeneolamia*.[www.ortoncatie.ac.cr](http://www.ortoncatie.ac.cr)
6. Carballo M, Guharay F. Control Biologico de Plagas Agricolas (2004) pág 39-41.
7. CIAT,1982.Ciclo de vida de *Aeneolamia*.[www.orton.catie.ac.cr](http://www.orton.catie.ac.cr)
8. CIAT.1982; Coto y Saunders,2004. Genero de *Aeneolamia*.  
[www.orton.catie.com](http://www.orton.catie.com)
9. Coronado,1978.Ciclo de vida de *Aeneolamia*. [www.orton.catie.ac.cr](http://www.orton.catie.ac.cr)
10. Coto y Saunders, 2004.Generalidades de *Aeneolamia*.  
<http://www.orton.catie.ac.cr>
11. Delgadillo O, Gómez M, Jiménez C. Evaluación de hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) para la regulación de las población de garrapatas (*Bophilus microplus*) del ganado bovino en la hacienda la esperanza del departamento de León en el periodo de Abril del 2006 a Agosto del 2007. Tesis UNAN-León 2007.
12. Gallegos. G. et al Entomopatógenos, Trillas, México. 2003. Pág. 141.
13. Gómez, 1983. Generalidades de la caña de azúcar.<http://www.sian.info.ve/>
14. Guagliumi, 1957; 1962.Taxonomía de *Aeneolamia*.[www.sian.info.ve](http://www.sian.info.ve).
15. Lacayo R. 2010, Variedades de *Saccharum officinarum* susceptibles *Aeneolamia varia*. Comunicación personal.

16. Leoucona. R 1995, Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Pág. 338.
17. Lista oficial de plagas reportadas en Nicaragua. MAGFOR. Managua, Nicaragua 2004.
18. Peck, 1998. Ciclo de vida de *Aeneolamia*. [www.orton.catie.ac.cr](http://www.orton.catie.ac.cr)
19. Peck, 2003. Reproducción y sitios de ovoposición de *Aeneolamia*.  
[www.orton.catie.ac.cr](http://www.orton.catie.ac.cr)
20. Peck. 2001. Especie de *Aeneolamia*. <http://www.scielo.unal.edu.co/>
21. Peck. 2001; Rodríguez et al 2003. Distribución geográfica y hospedante de *Aeneolamia*. [www.orton.catie.com](http://www.orton.catie.com)
22. Rodríguez, 2003. Ciclo de vida de *Aeneolamia*. [www.orton.catie.ac.cr](http://www.orton.catie.ac.cr)
23. Rojas S, 2010. Origen de la cepa BISA 01- de METHARISA, Comunicación personal.
24. Rosas J. Hongo entomopatógeno. Curso internacional de patología de insecto, Ciudad Victoria, Tamaulipas, 2000.
25. Uso de control biológico. UNA. Nicaragua, Managua. 2002
26. Vargas, 1970; CIAT, 1982. Ciclo de vida de *Aeneolamia*.  
<http://www.orton.catie.ac.cr>
27. Vargas, 1970. Patrones de comportamiento y distribución de *Aeneolamia*.  
[www.sian.info.ve](http://www.sian.info.ve)
28. [www.es.wikipedia.org/wiki/Saccharum\\_offifinarum](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Saccharum_offifinarum)
29. [www.nicaragua.sugar.estate.com](http://www.nicaragua.sugar.estate.com)

## X. ANEXOS



Foto N° 1. *Aenolamia varia* colectada en el cañaveral del Ingenio San Antonio, municipio de Chichigalpa, en la parcela El Ayote.2008





Foto N°2. Selección de *Aenolamia varia* para el montaje de bioensayo en condiciones de laboratorio. Campus Agropecuario UNAN-LEON 2008.



Foto N°3. Ninfas de *Aenolamia varia* antes de su colección en el cañaveral del ingenio San Antonio, municipio de Chichigalpa, en la parcela El Ayote 2008.