

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN - León

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

“Edgar Munguía Álvarez”



Evaluación de la patogenicidad y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en concentración de 10^{10} c/ml sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del Campus Agropecuario de UNAN-León 2011 -2012.

Autor:

Br. Meredith Jesuina González Martínez

Tesis para optar al título de Licenciada en Biología

Tutor:

Lic. Marcia del Socorro Gómez Vega

León, Nicaragua. Junio 2014

AGRADECIMIENTO

A mis padres *Adriana Mercedes Martínez Lanzas y Manuel Enrique González Morán*, por ser un ejemplo de disciplina y trabajo.

A **Lic. Marcia Del Socorro Gómez**, tutora del trabajo.

A **Tania Mendoza** (CEO) por darme un espacio para la recolección de moscas.

A **Yaoska Verónica Herrera Baca** por participar en la recolección, traslado y realización del bioensayo, muchas gracias por apoyarme en todo momento.

A **Flor de María Canales** y cada una de las personas que me ayudaron de una u otra manera para la realización de este trabajo.

Meredith Jesuina González Martínez

DEDICATORIA

A **Dios** por darme la vida y por ser el guiador en mi camino.

A mis padres **Adriana Mercedes Martínez Lanzas Y Manuel Enrique González Morán** por no abandonarme y darme su apoyo hasta en los momentos más difíciles.

A Todos mis compañeros de clase: **Rosalía Prado, Sendy Pichardo, Yaoska Herrera, Lucia Paiz, Aracely Toruño, Elizabeth Urbina, Wilber Herrera** que estuvimos en las buenas y en las malas.

Meredith Jesuina González Martínez

INDICE GENERAL

Agradecimiento	i
Dedicatoria	ii
Índice general	iii
Índice de Anexo	vi
Resumen	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1. Características generales morfológicas de Cucurbitáceas.....	5
4.1.1. Las flores.....	5
4.1.2. El fruto.....	5
4.2. Taxonomía de las Cucurbitáceas.....	6
4.3. Generalidades de Mosca Blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	6
4.3.1. Huevo.....	6
4.3.2. Ninfa.....	7
4.3.2.1. Primer ciclo.....	7
4.3.2.2. Segundos ciclo.....	7
4.3.2.3. Tercer ciclo.....	7
4.3.2.4. Cuarto ciclo.....	7
4.3.3. Adulto.....	8
4.4. Clasificación taxonómica de Mosca Blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	8
4.5. Distribución y hospederos de Mosca Blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	8
4.6. Control Microbiano.....	9
4.7. Hongos Entomopatógenos.....	9
4.7.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	9
4.7.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metch.) Sorokin.....	10
4.8. Morfología de <i>Metarhizium anisopliae</i>	10

4.9.	Taxonomía <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
4.10.	Patogenicidad y virulencia.....	11
4.11.	Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
4.12.	Modo de acción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
4.12.1.	Germinación de las conidias.....	11
4.12.2.	Formación de apresorio.....	12
4.12.3.	Penetración.....	12
4.12.4.	Colonización.....	12
4.12.5.	Reproducción del patógeno.....	13
4.13.	Toxinas.....	13
4.14.	Modo de entrada.....	13
4.15.	Sintomatología.....	13
4.16.	Toxicidad para otros organismos.....	14
4.17.	Ventajas de los Hongos Entomopatógenos.....	14
4.18.	Impacto ambiental de los Hongos Entomopatógenos.....	14
V.	MATERIALES Y METODO	15
5.1	Bioensayo (Basados en el manual de laboratorio para el manejo de Hongos - Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa.....	15
5.1.1	Colección de Insectos.....	15
5.1.2	Traslado.....	15
5.1.3	Desinfección del alimento.....	15
5.1.4	Preparación de la Suspensión Fungosa.....	15
5.1.5	Medición de la concentración de suspensión fungosa.....	15
5.2	Prueba de patogenicidad.....	16
5.3	Prueba de viabilidad.....	16
5.4	Lectura del bioensayo.....	16
5.5	Medición de la esporulación.....	17
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.1.	Porcentaje de mortalidad (Gráfico No. 1).....	18
6.1.2.	Datos porcentaje de mortalidad en otros estudios.....	19

6.2.	Porcentaje de esporulación (Gráfico No. 2).....	21
6.2.1.	Porcentaje de esporulación en otros estudios.....	21
VII.	CONCLUSIONES	23
VIII.	RECOMENDACIÓN	24
IX.	BIBLIOGRAFÍA	25
X.	ANEXOS	28

ÍNDICE DE ANEXOS

10.1.	Resultado de conteo de conidias.....	29
10.2.	Prueba de viabilidad.....	29
10.3.	Porcentaje de esporulación.....	29
10.4.	Tabla de mortalidad y esporulación.....	29
Tabla 1.	Numero de Moscas muerta por día en tres repeticiones.....	29
Tabla 2.	Numero de Moscas esporuladas por día en tres repeticiones.....	29
10.5.	Imágenes tomadas en el momento de la investigación.....	30
Foto 1.	Recolección de insectos en cultivo de Cucurbitaceae.....	30
Foto 2.	Observación de Mosca Blanca por Estereoscopio.....	30
Foro 3.	Montaje de bioensayo.....	31
Foto 4.	Montaje de bioensayo.....	31
Foto 5.	Día 3 de observación midiendo la esporulación.....	32
Foto 6.	Día 5 de observación midiendo la esporulación.....	32
Foto 7.	Día 7 de observación midiendo la esporulación.....	33
Foto 8.	Día 9 de observación midiendo la esporulación.....	33
Foto 9	Día 11 de observación midiendo la esporulación.....	34
Foto 10	Día 13 de observación midiendo la esporulación.....	34
Foto 11.	Día 15 de observación midiendo la esporulación.....	35
Foto 12.	Día 17 de observación midiendo la esporulación.....	35

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar la patogenicidad y esporulación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin cepa Metagreen sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia Tabaci*). El trabajo se llevó a cabo en condiciones de laboratorio utilizando 1500 adulto de Mosca Blanca, recolectadas en cultivos de Cucurbitaceae ubicados en el Centro Experimental de Occidente (CEO), estas fueron inoculados con la cepa Metagreen para realizar la prueba de Patogenicidad haciendo uso de la técnica de aspersión, la concentración usada fue de 10^{10} conidias/ml se realizaron 3 bioensayos con tres repeticiones cada uno, utilizando 500 Moscas para cada Bioensayo, evaluándolo día de por medio en términos de Porcentaje tanto la mortalidad como la esporulación. Las primeras muertes de las Moscas se dan al tercer día de infestadas. El mayor porcentaje de mortalidad se presentó el día 11 para el primer bioensayo con 81% de Moscas muertas, el segundo bioensayo con 80% y el tercer bioensayo con 85%. Los primeros porcentajes de esporulación se dieron al tercer día para cada bioensayo, los porcentajes más altos se presentaron el día 17 para el primer bioensayo con un 67% el segundo bioensayo con un 76% y el tercer bioensayo con un 71% de Esporulación. La prueba de viabilidad se realizó colocando 5 gotas de suspensión del Hongo en un plato Petri con PDA (Papa, Dextrosa y Agar) con medio de cultivo, se colocó en el incubador a temperatura 20 a 27 °C. Con 24 horas de haber colocado el plato Petri se realizó la lectura obteniendo un 94.36% de germinación de conidias, determinando la presencia del Hongo en la mortalidad de las Moscas. Considerando así a *Metarhizium anisopliae* como promisoras de acuerdo al valor del porcentaje de mortalidad corregida y porcentaje de esporulación.

I. INTRODUCCIÓN

En el siglo XVII, se concibió la idea de atacar a los organismos perjudiciales mediante organismos que actuaran como enemigos de ellos bajo condiciones naturales. El desarrollo y aplicación de agentes de control biológico de plagas adquiere una importancia relevante como una alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el medio ambiente para las futuras generaciones. El control biológico de plagas es una forma de manejar poblaciones de animales o plantas. Es una técnica milenaria que consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de sus poblaciones. En el mundo se han utilizado diferentes grupos de organismos benéficos, siendo los insectos el grupo taxonómico con mayor uso (Sediles, A. 2000).

En Nicaragua las infestaciones de la Mosca Blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) empezaron a cobrar importancia a partir de 1973, dado sus efectos sobre el cultivo del algodón. En 1986 se inician los primeros reportes de daño por este insecto sobre el cultivo del tomate. En la década de los 90 se producen grandes infestaciones y severas pérdidas sobre varios cultivos, tales como tomate, chiltoma (chile dulce), cucurbitáceas, frijol y tabaco, alcanzándose las pérdidas más dramáticas en el cultivo de tomate. Los daños directos causados por este insecto se deben a su alimentación a expensas de los nutrientes de la planta y a desórdenes fisiológicos causados por el biotipo B, mientras que los indirectos se deben al crecimiento de hongos sobre la excreción de melaza por la Mosca Blanca y a la habilidad de transmitir virus (Sediles, A. 2000)

En la naturaleza, los Hongos Entomopatógenos pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos. Estos hongos se encuentran en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas; logrando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Constituyen, además, el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas (Fragas. 2006)

Existen varios tipos de organismos entomopatógenos tales como virus, bacterias, hongos, y nematodos. Actualmente, se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que afectan plagas de cultivos de importancia económica; muchos de ellos son utilizados exitosamente en programas de control biológico. Algunos de estos entomopatógenos son reproducidos masivamente y se venden comercialmente (Monzón. 2001).

Productores han logrado reducir el daño causado por las plagas mediante el uso de estos agentes microbianos sin afectar la salud humana ni el ambiente. Además sus cosechas están libres de plaguicidas sintéticos. En Nicaragua se ha desarrollado una metodología para la producción Semi-industrial como es *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 las conidias verdes que forman 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 de los insectos, el hongo invade los tejidos del insecto y lo mata apoyado por toxinas proteicas (Monzón. 2001).

El propósito de esta investigación es verificar las características toxicológicas de la cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* sobre adulto de Mosca Blanca *Bemisia tabaci* usando una concentración de 10^{10} c/ml.

II. OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar la patogenicidad y esporulación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en concentración de 10^{10} c/ml sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*).

ESPECÍFICOS

- Determinar la mortalidad en adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) causado por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen.
- Evaluar el tiempo de esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en laboratorio.

III. HIPÓTESIS

- H₀. La Cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin en concentraciones de 10¹⁰ c/ml es patogénica para adultos de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*).
- H₁. La cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin en concentraciones de 10¹⁰ c/ml no es patogénica para el adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Características generales morfológicas de Cucurbitáceas. *(Basados en el folleto creado por Dulmus B, Rolando. Curso de taxonomía de plantas vasculares superiores. Agosto 2002. Fac. Ciencia Dpto. Biología UNAN - León).*

Cucurbitáceas: La familia contiene unas 760 especies de distribución primordialmente tropical y subtropical. Muchas de ellas son una importante fuente de alimento para el ser humano, también hay especies productoras de fibras. Las características de esta familia hacen que las plantas sean fáciles de identificar. Se caracterizan por estar formadas por enredaderas, trepadoras o rastreras, son de crecimiento rápido con hojas palmatilobadas, con largos tallos no leñosos. Presentan unos zarcillos, los cuales son proyecciones o emisiones delgadas que brotan de los tallos, arrollados en espiral que se agarran y enrollan en torno a los objetos cercanos para fijar o sujetar la planta, a esto se le conoce como tropismo (movimientos o direcciones de crecimiento que siguen las plantas debido a impulsos externos; fototropismo: crecimiento de las plantas al estímulo de la luz, escototropismo: crecimiento de las plantas hacia la oscuridad).

4.1.1. Las flores

Son unisexuales (es decir, masculinas o femeninas). Por lo general son de color amarillento, se suelen abrir durante muy poco tiempo, a menudo menos de un día.

4.1.2. El fruto

Consiste en una cáscara dura que encierra una pulpa carnosa con abundantes semillas; el nombre botánico que se le da a este fruto es pepónide. Las especies de esta familia están adaptadas a los climas cálidos y no toleran las temperaturas inferiores al punto de congelación (0°C). No obstante, se cultivan en regiones de clima templado con veranos largos y cálidos. Estas plantas son pobres en nutrientes pero muy ricas en agua.

4.2. Taxonomía de las Cucurbitáceas

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Cucurbitales
Familia:	Cucurbitaceae
Género:	Cucúrbita
Especie:	<i>Cucúrbita pepo</i>, <i>Cucúrbita argyrosperma</i>

(Dulmus B, Rolando. Curso de taxonomía de plantas vasculares superiores. Agosto 2002. Fac. Ciencia Dpto. Biología UNAN - León).

4.3. Generalidades de Mosca Blanca Reconocida por investigadores y agricultores a fines del siglo XIX, la Mosca Blanca ha sido limitante en la agricultura mundial desde 1970. Pertenecen al Orden: Homóptera (pulgones o áfidos, cóccidos, moscas blancas, cochinillas), familia: Aleyrodidae es una especie ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde se alimenta de más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres. La reproducción de las moscas blancas puede ser sexual o por partenogénesis. Cuando es sexual, es decir, con la participación del macho y la hembra, la generación va a ser también de machos y hembras.

La Mosca Blanca presenta metamorfosis incompleta, por tal razón pasa por los estados de Huevo, Ninfa y Adulto (Román, 2010)

4.3.1. Huevo

Las hembras, en ocasiones, colocan los huevos en grupos, en círculos, en semicírculos o aisladamente en el envés de las hojas. El huevo es de forma ovalada, teniendo forma de punta en el ápice (como punta de lanza), la base es redondeada y está provista de un pedicelo que se encuentra inserto en el tejido de la hoja y lo mantiene en posición vertical. El primer día, el color es blanco verdoso, posteriormente toma un color amarillo y se va oscureciendo hasta tornarse café claro. El promedio de duración del estado de huevo es de 2.4 a 5.1 días (Alas, 2000).

4.3.2. Ninfa

Las ninfas desarrollan sus alas en el exterior de la pared del cuerpo como pliegues visibles. Cada Ciclo superior de las ninfas va adquiriendo más parecido al adulto. El estado de ninfa pasa por cuatro instar:

4.3.2.1. Primer ciclo

La ninfa es móvil, por lo que se denomina crawler o gateador. Es de forma elíptica, ligeramente angosto en la parte dista, rompe el huevo desde el ápice longitudinalmente. Inicialmente saca la cabeza del corión, en donde se empuja lentamente por movimientos de contracción y expansión del abdomen en forma alternativa. Al emerger camina por el envés de la hoja hasta que encuentra un sitio adecuado para alimentarse, inserta el estilete y comienza a succionar la savia del vegetal. El color de esta ninfa es blanco verdoso y el período de duración es de 2.4 a 7.1 días (Alas, 2000).

4.3.2.2. Segundo ciclo

Tiene forma oval con una leve constricción en el tercio proximal y dura de 2.4 a 6.7 días. La ninfa es blanco verdosa, cristalina y aplanada al principio y opaca y túrgida al final, este instar ya se encuentra inmóvil sobre la hoja (Alas, 2000).

4.3.2.3. Tercer ciclo

La ninfa no sufre mayores cambios del segundo al tercer instar. La duración varía de los 2.6 a los 8 días (Alas, 2000).

4.3.2.4. Cuarto ciclo

Al pasar la tercera muda, la ninfa pasa al cuarto instar, en donde se dan dos fases: la primera en donde se alimenta y una posterior en donde sufre algunos cambios morfológicos y deja de alimentarse; por lo que algunos le llaman pupa, pero por ser un insecto de metamorfosis incompleta no es una verdadera pupa. La fase inicial dura de 2.5 a 8.5 días y la fase pupal de 3.1 a 9.2 días. Al comienzo del cuarto instar, la ninfa es plana y transparente y al final es abultada y opaca, en donde se pueden observar los ojos rojos del adulto ya formado (Alas, 2000).

4.3.3. Adulto

El adulto emerge rompiendo la cápsula pupal en forma de “T” invertida, que comienza desde la cabeza hasta la separación del tórax y abdomen. El adulto recién emergido es de color amarillo pálido, pero después de tres a cinco horas toma un color blanco debido al polvo ceroso con que se cubre. Las hembras ovipositan durante todo su ciclo un promedio de 80 huevos, iniciando desde la emergencia hasta un día antes de su muerte o incluso el mismo día. Las hembras adultas viven un promedio de 15 días y los machos 12 días. La relación entre machos y hembras es de 1:1. (Alas, 2000).

4.4. Clasificación taxonómica de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*)

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Infra clase:	Neoptera
Súper orden:	Exopterygota
Orden:	Hemiptera
Suborden:	Sternorrhyncha
Súper familia:	Aleyrocloidea
Familia:	Aleyrodidae
Género:	Bemisia
Especie:	<i>Bemisia tabaci</i>

(Maes, Jean Michael. *Insectos de Nicaragua volumen I. Catálogo de los insectos y los artrópodos terrestres de Nicaragua* pág. 215).

4.5. Distribución y hospederos de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*)

La Mosca Blanca vuela de un cultivo o maleza a otro; cuando sus poblaciones son altas o la planta es vieja, vuelan buscando plantas más jóvenes, influenciadas principalmente por el viento. Al estudiar algunos campos de cultivo se encontrarán mayores poblaciones de adultos en los rumbos predominantes del viento. Mientras que los estados inmaduros se

encontrarán en mayor cantidad en las áreas centrales de la plantación. La Mosca Blanca se encuentra en el envés de las hojas, en todos los estratos de la planta, ya sea en los estados de huevo, ninfa y adulto. Los adultos se localizan en el estrato superior, o sea en los brotes; en las partes intermedias de las plantas se encuentran altas densidades de todos los estadios ninfales y en las hojas más viejas o sazonas, se observan ninfas del último estadio ninfal y cubiertas ninfales vacías (Román, 2010).

4.6. Control microbiano

Es la utilización de microorganismos entomopatógenos o sus productos que sirven para disminuir las densidades poblacionales de los insectos plagas dentro de estos microorganismos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos. 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 tiene como agente causal un hongo. Dentro de los principales Hongos Entomopatógenos tenemos los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aschersoni*, *Hirsutella*, *Nomureae* (Leoucona, 1995).

4.7. Hongos Entomopatógenos

Los hongos o mycota usados para el control de insectos son llamados hongos entomopatógenos. Son un grupo de micro-organismos ampliamente estudiados, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros. Pueden parasitar a diferentes tipos de Artrópodos (insectos y ácaros) (Carballo, 2004). Dentro de los Hongos Entomopatógenos más estudiados y utilizados en el control microbiano están: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* (Monzón, 2001).

4.7.1. *Metarhizium anisopliae*

Es el agente causal de la muscardina verde y es un patógeno de más de 300 especies de siete órdenes de insectos. Los coleópteros son los hospederos más comunes. Es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado para el control microbiano y es el hongo más usado en Latinoamérica (Carballo, 2004).

4.7.2. *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin

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*, desde entonces es considerado candidato importante en el control microbiológico (Carballo, 2004).

4.8. Morfología de *Metarhizium anisopliae*

Visto al microscopio presenta células conidiogénicas (Filiadas) 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 masa solidas de cadenas paralelas, de verde pálido a brillante a verde-amarillo, u oliváceo. *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* presenta conidios cortos de 3.5 a 9 μm mientras que *Metarhizium anisopliae* var. Presenta conidios de 9 a 18 μm . Los cadáveres de los insectos afectados, se observan completamente cubiertos con micelios del hongo de color blanco. Cuando el hongo esporula sobre el cadáver, adquiere una coloración verdosa (Carballo, 2004).

4.9. Taxonomía *Metarhizium anisopliae*

Reino:	Mycete
División:	Amustigomicotin
Sub- división:	Deuteromycitina
Clase:	Deuteromicetes
Sub-clase:	Hypomicetes
Orden:	Moniliates
Familia:	Moniliacece
Género:	<i>Metarhizium</i>
Especie:	<i>anisopliae</i>

(Alexopoulos y mims, 1979; McCoy *et ál.*, 1988, Samson, 1988, citado por gallegos, *et ál.*, 2003)

4.10. Patogenicidad y virulencia

Patogenicidad es la capacidad de un organismo en provocar una enfermedad. Es un atributo cualitativo, es decir el 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 (Carballo, 2004).

4.11. Ciclo de vida de *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 en 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 soprofiticamente 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 clase de crecimiento de micelio hacia el exterior que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie y rodeando el cadáver del insecto (Carballo, 2004).

4.12. Modo de acción de *Metarhizium anisopliae*

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 en el interior del insecto (Carballo, 2004).

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

4.12.1. Germinación de conidias

Una excelente germinación ocurre en 12 horas con temperaturas de 23-30 °C y una humedad relativa de un 80%, requiriendo de fuentes de nitrógenos, carbono y energía para

la formación de tubo germinativo. La habilidad del hongo para utilizar estos elementos esta en función de su agresividad, virulencia, cantidad de esporas (requeridas para matarlo), tiempo de germinación y penetración después de la adhesión de la cutícula del hospedero (Carballo, 2004).

4.12.2. Formación de apresorio

En la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura. Este tubo germinativo penetra por aberturas naturales del insecto (tráqueas, poros y regiones intersegmentales (Carballo, 2004).

4.12.3. 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 el estímulo que causan la orientación del tubo germinativo de las esporas a través de la cutícula, indican algunas formas de reconocimiento químico como pre-requisito para la penetración. La penetración esta dividida en dos procesos principales; A) Físico: es cuando las hifas rompen áreas membranosas o esclerosadas y B). Químico: es cuando el hongo produce enzimas como las proteasas, lipasas y quinasas 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 inter segmentales son probablemente las áreas más comunes de penetración (Carballo, 2004).

4.12.4. Colonización

A partir de la penetración inicia un proceso de colonización del hospedero, en 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 tráqueas. El tiempo de colonización podría variar entre 76-120 horas dependiendo del patógeno, del insecto y las condiciones ambientales (Carballo, 2004).

4.12.5. Reproducción del patógeno

Después de 4 a 5 días de muerto el insecto comienza a emerger hifas por los espiráculos y regiones intersegmentales y después de 24 o 48 horas de la emergencia de las hifas se inician la formación de conidias, esto se logra dependiendo del patógeno temperatura humedad y radiación ultra violeta (Carballo, 2004).

4.13. Toxinas

Metarhizium anisopliae produce varias toxinas entre ellas los A, B, C, D y las desmetidextruxina B y otras como A1, A2, B1, C2, D1, D2 E1. Estos compuestos tóxicos varían con la especie del insecto. Otros son las cytochalasinas que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad en insectos afectados por *Metarhizium* (Carballo, 2004).

4.14. 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 tejidos, es muy importante la participación de las Dextruxinas que tienen insecticidas propios. 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 matan al hospedero al provocar una degradación progresiva de sus tejidos debido a la pérdida de integridad estructural de las membranas y la consecuencia es deshidratación de las células por pérdida de fluidos. (Carballo, 2004).

4.15. Sintomatología

Los insectos enfermos presentan cambios de conductas, entre ellas cese de la alimentación, pérdida de coordinación, movilización a partes de altas de las plantas en que se encuentran o se movilizan hacia la superficie del suelo en caso de insectos del suelo y síntomas como cambios de coloración del tegumento o manchas en la piel (Carballo, 2004).

4.16. Toxicidad para otros organismos

Estos hongos no tienen efectos sobre organismos como vertebrados y sobre la salud humana. No se ha encontrado efectos negativos del hongo sobre las abejas en el campo (Carballo, 2004).

4.17. Ventajas de los hongos entomopatógenos

Estos Organismos poseen alto grado de aceptación ecológica entre ellas:

- Control permanente: los Hongos Entomopatógenos logran introducirse y colonizar los agroecosistemas y mantener su población. Son específicos a nivel de familia.
- Rentabilidad: los insumos biológicos son baratos al igual que su manejo, lo que representa un ahorro considerable en los costos de producción (Leoucona, 1995).

4.18. Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos

Algunos Hongos Entomopatógenos son bastantes específicos, diversos estudios sobre afectos secundarios han indicado que no se pone en riesgo a organismos acuáticos, poco o ningún impacto sobre artrópodos terrestres y no afecta vertebrados al inhalar las esporas (Leoucona, 1995).

V. MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se realizó en el Campus Agropecuario de la UNAN-León, específicamente en el laboratorio de hongos entomopatógenos. El Campus Agropecuario se ubica a 1 km y ½ al este de la ciudad de León (Nicaragua), carretera a la Ceiba.

5.1. Bioensayo (*Basados en el manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa*).

5.1.1. Colección de Insectos.

La recolecta de adultos de mosca blanca, se realizó con técnicas improvisadas para su captura en cultivos de Cucurbitáceas ubicados en El Centro de Experimento de Occidente (C.E.O). Utilizando diferentes frascos para poder manipularlas. (Anexo Foto No. 1)

5.1.2. Traslado.

Una vez las moscas en los frascos, se colocaron en cajas para facilitar el transporte de estas, dejando un espacio para que las moscas pudieran tener oxígeno.

5.1.3. Desinfección del Alimento.

El alimento consistió en las hojas de Cucurbitáceas, lavadas con agua y luego se sumergió en hipoclorito de sodio al 2%, posteriormente se ubicaron en los frascos donde se capturaron las moscas.

5.1.4. Preparación de la Suspensión Fungosa.

Se pesó 4gr. de hongo (*Metarhizium anisopliae*) y se colocó en un frasco con 260 ml de agua estéril, luego se agito hasta obtener una suspensión fungosa homogénea.

5.1.5. Medición de la Concentración de Suspensión Fungosa.

Para los bioensayos se utilizó una suspensión fungosa en concentración de 10^{10} conidias/ml. Para determinar la concentración total de la suspensión, se realizó el conteo de conidias utilizando la cámara de Neubaver, empleando el campo más pequeño de la cámara. Se utilizó la fórmula propuesta por Alves (1986), para obtener el valor final de conidias por ml.

$$X = 25 \times 4 \times 10^6 \times \text{volumen de dilución}$$

Donde: X= Promedio de conidias en 3 repeticiones

25= Número de cuadrantes

4×10^6 = factor de cuadrantes pequeños (diámetro/ profundidad/ volumen).

5.2. Prueba de Patogenicidad

Se establecieron tres bioensayos, colocando 500 moscas en frasco de vidrio para cada repetición en el laboratorio. En cada uno, se realizó un rociado de dilución de 10^{10} conidias/ml. sobre las moscas. Cada dos días se comprobó sobrevivencia de las moscas en los frascos. Este proceso se continuó hasta el día 17 que concluyó la evaluación para cada bioensayo. (Anexo Tabla No. 1).

La mortalidad fue medida en porcentaje (Gráfico No. 1), utilizando la siguiente fórmula:

$$X = \frac{\# \text{ De moscas muertas /}}{\# \text{ De moscas empleadas en el bioensayo}} \times 100$$

5.3. Prueba de Viabilidad

Se realizó tomando una muestra de la solución del hongo, utilizado en la inoculación con los insectos, se colocaron 5 gotas en el medio de cultivo Papa, Dextrosa y Agar (PDA). Los efectos fueron analizados 24 horas después con ayuda de un microscopio (100x), observando las conidias germinada, no germinadas y las conidias totales de *Metarhizium anisopliae*. (Anexo Foto No. 2). El porcentaje de viabilidad se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Conidias Germinadas}}{\text{Total de Conidias}} \times 100$$

5.4. Lectura del Bioensayo

Lectura de mortalidad sobre los insectos se realizó desde el primer día hasta el día 17 después de la inoculación, con recuentos los días 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 se contabilizaron los insectos vivos y los muertos. (Tabla No. 1 de anexos).

5.5. Medición de la Esporulaci3n

Los insectos muertos se montaron en c3maras h3medas por un lapso de 3 a 17 d3as con el objetivo de proporcionar al hongo las condiciones 3ptimas para que se pudiera esporular o simplemente que se desarrollara el micelio para el hongo, el micelio se identific3 por el color blanco y se observo entre las conidias de *Metarhizium* un color verde oscuro. (Anexo Fotos No. 5 - 12).

Se utiliz3 como c3mara h3meda platos Petri con papel toalla, donde se colocaron los insectos muertos. (Foto No. 3 y 4). Se agregaron 3 gotas de agua, se sell3 y se colocaron en condiciones ambientales de 25 a 27 °C, se revis3 cada dos d3as, con el fin de conocer el tiempo que tardo el hongo en esporular. (Anexo Tabla No. 2).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Porcentaje de mortalidad

Las primeras observaciones de mortalidad se dan desde el día 3, el porcentaje de mayor mortalidad de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) ocasionadas por el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin cepa Metagreen, se observó a los once días de infectadas (Gráfico No 1). En el bioensayo 1 el porcentaje de mortalidad fue de 81%, en el bioensayo 2 la mortalidad fue de 80%, y el bioensayo 3 la mortalidad fue de 85%, siendo este el mayor porcentaje de los tres bioensayos. La mortalidad desciende a medida que pasaron los días de inoculación hasta el día 17, comprobando de esta manera que el hongo (Metsch) Sorokin cepa Metagreen es patogénica con el adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en condiciones de laboratorio.

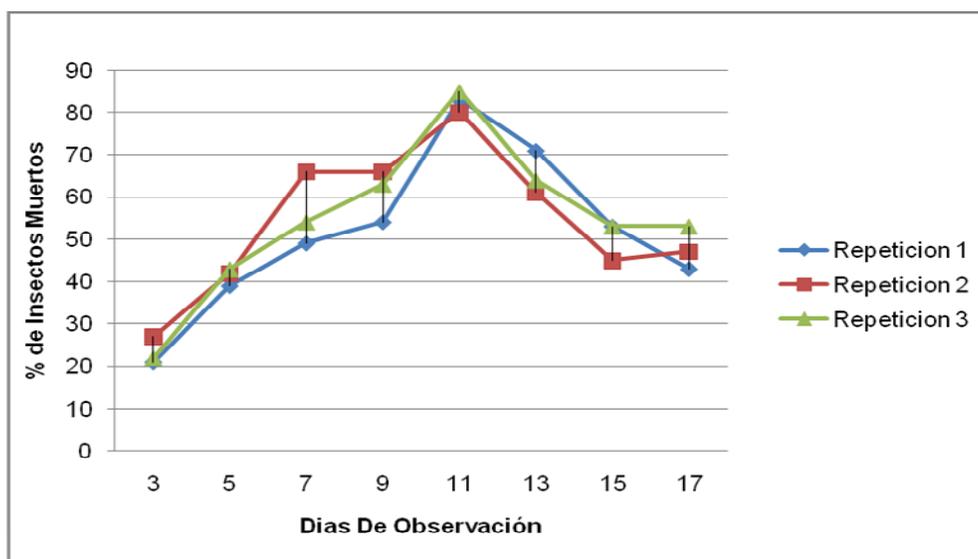


Gráfico No. 1. Porcentaje de mortalidad de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) a causa de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin cepa Metagreen en condiciones de laboratorio

6.1.2. Porcentaje de mortalidad en otros estudios.

En 2006, S. Castillo Zenor, de Costa Rica realizó un estudio en Guatemala utilizando cepas de *Metarhizium anisopliae* (PL-43), para el control de Salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens*, la dosis fue de 2.5×10^{12} esporas/ha, midiendo mortalidad tanto en ninfas como en adulto, según los datos obtenidos estos resultados indican que las cepas de *Metarhizium anisopliae* no tuvieron efecto de control sobre las ninfas ni en los adultos de las especies de *Aeneolamia albofasciata* y *Prosapia simulans* en condiciones ambientales. La disminución en algunos de los muestreos se debe más a factores climáticos en ciertos momentos.

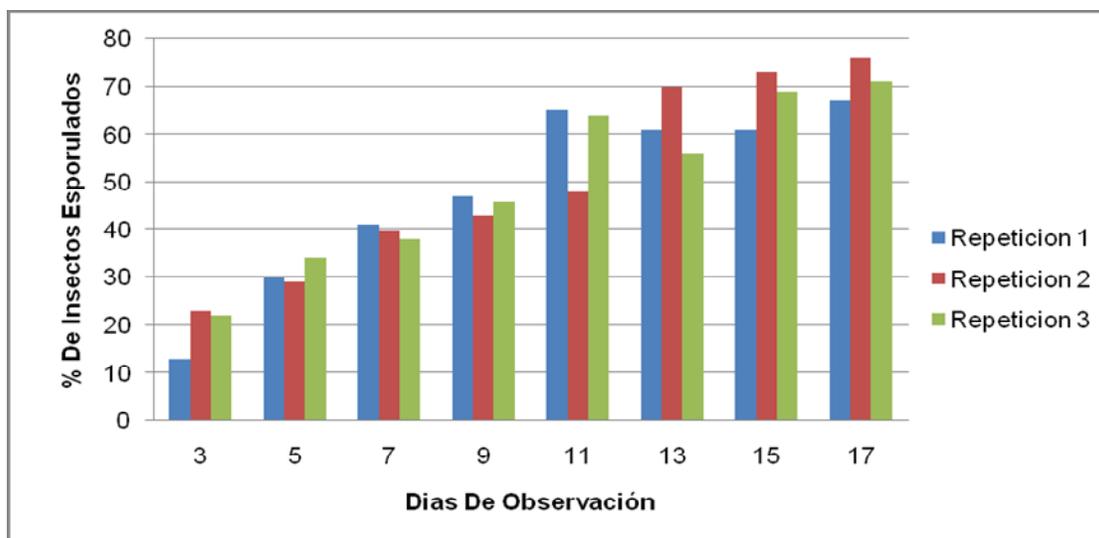
En el año 2008, Yuly A. Lemus, Ginna M. Rodríguez, Raúl A. Cuervo, Jorge A. Durán Vanegas, Claudia L. Zuluaga, Gloria Rodríguez, llevaron a cabo un estudio para determinar la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para controlar la hormiga arriera (*Atta cephalotes*), utilizando dosis de 7.48×10^9 , sus datos obtenidos son similares a los realizados con Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*), los primeros síntomas de mortalidad se dan al día 4 de infectación y para el día 7 todos los insectos habían muerto obteniendo así un 100% de mortalidad, pero es de importancia señalar que antes de realizar este estudio la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) no fueron desinfectados una vez obtenido del campo y cual tampoco tenían certeza de su ciclo de vida. Su conclusión es basada al momento de ver la esporulación del hongo en los insectos después de muertos.

Otro estudio realizado utilizando *Metarhizium anisopliae* es el de J. Jaramillo González en el año 2012 en Colombia, con el fin de evaluar y validar en campo el efecto que tiene la cepa *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin sobre la broca que emergen de frutos infectados en el suelo, a nivel de Laboratorio obtuvo un 91% y un 94% de efectividad, pero combinando las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, por separados ambas cepas son igual a los resultados del testigo, en condiciones de campo obtuvieron un 18% y un 47% de efectividad con respecto al testigo. Lograron observar y comprobar que ambas cepas combinadas no solo actuaba con los insectos infestados sino que también en nuevas generaciones, es decir que la ovoposición fue reducida en un 75% y un 87% en comparación del testigo.

En el año 2012, M. Hurtado y R. Juárez de Nicaragua utilizaron la cepa (*Metarhizium anisopliae*) (Metsch) Sorokin cepa Metagreen, ellos utilizaron garrapata de ganado (*Boophilus micropus*), comparando los datos que ellos obtuvieron en laboratorio se observa que la mortalidad se da también al día tres después del contacto con el hongo y su mayor porcentaje de mortalidad fue del 83%, a pesar de la diferencia con que se obtuvo el mayor porcentaje se confirmó que ambas especies de insectos son patogénicos *Metarhizium anisopliae*.

6.2. Porcentaje de Esporulaci3n

La esporulaci3n en las moscas ascendieron al finalizar el periodo de investigaci3n (Grafico No. 2), los primeros porcentajes se dieron al tercer d3a para cada bioensayo, los porcentajes m3s altos se presentaron el d3a 17 obteniendo los siguientes valores: para el bioensayo 1 con un 67% bioensayo 2 con un 76% y el bioensayo 3 con un 71% de esporulaci3n. (Foto No. 12)



Graf3ca No. 2 Porcentaje de Esporulaci3n de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin cepa Metagreen sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*).

6.2.1. Porcentaje de esporulaci3n en otros estudios.

Comparando los datos obtenidos (grafico No. 2), con el estudio en el a3o 2006 de S. Castillo Zenor, de Costa Rica utilizando cepas de *M. anisopliae* (PL-43), para el control de Salivazo, encontr3 dificultades para la esporulaci3n del hongo entomopat3geno, debido a que los insectos rociados por el hongo estuvieron expuestos al medio ambiente y no hubo control sobre factores ambientales, a diferencia con los datos obtenidos en este estudio con Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*), solo fue llevado a nivel de laboratorio proporcionando el mayor control para la esporulaci3n del hongo.

Los datos de Y. Lemus, G. Rodr3guez, R. Cuervo, J. Dur3n Vanegas, C. Zuluaga, G. Rodr3guez, para determinar la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* y controlar la hormiga arriera (*Atta cephalotes*), utilizando dosis de 7.48×10^9 , para la esporulaci3n del hongo hicieron dos tipos de ensayos, uno donde colocaban los insectos en platos Petri con

poco oxígeno y otro donde colocaron los insectos en tubos con más oxígenos luego haciendo la comparación el hongo se desarrolló mejor con los tubos puesto que presentaron las condiciones adecuadas para su desarrollo, y tomando este como referencia para hacer el conteo de insectos esporulados, pero aun así el hongo se desarrolló muy lento . A diferencia con Mosca Blanca debido a que los insectos muertos se colocaron todos en platos Petri las condiciones estaban más controladas produciendo una eficaz reproducción del hongo, lo cual nos llega a concluir que el hongo *Metarhizium anisopliae* se reproduce y causa mejores efectos siempre y cuando se cuiden las condiciones del medio ambiente. Aunque también podríamos tener en cuenta que la Mosca Blanca es más pequeña que las hormigas arriera lo cual podría suponer un cambio en su sistema al momento de tener contacto con el hongo y también que las dosis fueron diferentes en los dos estudios en este caso la dosis de 1×10^{10} es más efectiva que 7.48×10^9 , estos datos podrían tenerse en cuenta al momento de realizar otros estudios con ambas especies.

De acuerdo a los datos obtenidos en el año 2012 por M. Hurtado y R. Juárez de Nicaragua, con la utilización de *Metarhizium anisopliae* su mayor porcentaje de esporulación se da a los diez días de observación con un 100%, si bien ellos obtuvieron un porcentaje mayor en sus datos, podríamos tener en cuenta que en nuestra investigación con las moscas se utilizaron más números de individuos en comparación a ellos y no se tomó en cuenta los días que no se estableció para la medición que solo eran de 17 días.

VII. CONCLUSIONES

Después de haber realizado el estudio sobre comportamiento del hongo entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* sobre adulto de Mosca Blanca *Bemisia tabaci* y tomando la Patogenicidad expresada en la mortalidad, el porcentaje de insectos esporulados y la manera en cómo se comportó la esporulación a través del tiempo, podemos concluir que:

- El hongo *Metarhizium anisopliae* es patogénico sobre adulto de Mosca Blanca *Bemisia tabaci* debido a que se logró obtener un máximo de mortalidad de 85%.
- Los insectos lograron esporular obteniendo los primeros resultados en el día 3 después de la muerte de los insectos y obteniendo un máximo de 76%.

Se Comprobó que *Metarhizium anisopliae* cepa Metagreen es patogénica sobre los adultos de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*).

En relación con otros estudios realizados utilizando diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* para que sea efectivo hay que tener en cuenta:

- A nivel de laboratorio, tiene que haber control de: temperatura, humedad, Oxigenación.
- Dependiendo del insecto en estudio el porcentaje de mortalidad y esporulación va a variar significativamente.
- Los estudios realizados en campo se hace más difícil la efectividad por estar expuesto a cambios climático.
- Si comparamos los datos obtenidos en campo y los datos obtenidos en laboratorio se nota mejor resultado en laboratorio, lo cual nos lleva a valorar que en campo posiblemente las dosis tengan que ser más alta para poder tener mejores resultados (por haber mayor número de insectos y el estar expuestos al medio ambiente).

VIII. RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos podemos recomendar que:

- El hongo *Metarhizium anisopliae* causante de la mortalidad en adulto de Mosca Blanca en laboratorio debe ser evaluado en condiciones de campo.
- Realizar estudios en diferentes concentraciones de sustancias para conocer si existen cambios en la mortalidad o en la esporulación.
- Crear combinación con otros Hongos Entomopatógenos para conocer si los resultados se igualan o se mejoran.
- Probar la efectividad del hongo *Metarhizium anisopliae* en época de lluvia.
- Crear un proyecto para la reproducción de *Metarhizium anisopliae*, creando así mayor facilidad a los estudiantes en investigaciones futuras.
- Los laboratorios tienen que prestar las condiciones adecuadas como microscopios, estereoscopios que ayuden a la manipulación de los insectos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alas, M. 2000. Evaluación de la efectividad de cuatro insecticidas biológicos para el control de ninfas de Mosca Blanca *Bemisia tabaci*, en el cultivo de melón *cucumis melo*. Finca los Yajes, del municipio de Estanzuela. Tesis. Zacapa, Guatemala. Disponible en web: <http://cunari.edu.gt>
- Alexopoulos y mims, 1979; McCoy *et al.*, 1988, Samson, 1988, citado por gallegos, et al, 2003
- Carballo, M. Control Biológico de Plagas. Plaguicidas – Aspectos Ambientales. 1ª ed. – Mangua: CATIE, 2004. 232p (Serie técnica. Manual técnico/ CATIE; N° 53 ISBN 99924-0-316-0).
- Castillo Zeno, S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. CATIE: Programa de educación para el desarrollo y la Conservación. Escuela de posgrado. Turrialba, Costa Rica. Disponible en web: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>
- Dulmus B, Rolando. Curso de taxonomía de plantas vasculares superiores. Agosto 2002. Fac. ciencia Dpto. Biología Unan León
- Fragas, I.; Gema, G. F.; Hidalgo, L. 2006. Formulación de Hongos Entomopatógenos como control biológico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Disponible en web: <http://www.scielo.unal.edu.co>
- Hurtado, M; Juárez, R. 2012. Evaluación de la Patogenicidad y Esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en control de garrapata del ganado (*Boophilus microplus*) en su fase parasítica en estado ninfal en dos etapas: en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la UNAN –León y finca Las Mercedes del Municipio de Malpaisillo. Tesis Ing. Agroecológica Tropical. León, Nicaragua

- Jaramillo González, J. L. 2012. Evaluación y validación de mezclas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control de la broca del café en frutos infestados caídos al suelo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Entomología Medellín, Colombia.
Disponible en web: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8877/1/1053765208.2012.pdf>
- Lemus, Yuly A.; Rodríguez, Ginna M.; Cuervo, Raúl A.; Durán Vanegas, Jorge Antonio; Zuluaga, Claudia Liliana; Rodríguez, Gloria. Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) Revista Científica Guillermo de Ockham, Vol. 6, Núm. 1, enero-junio, 2008, pp. 91-98. Universidad de San Buenaventura, Sede Cali, Colombia. Disponible en web: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=105312257007>
- Leoucona. R. 1995, microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aire.
- Maes Jean Michael. Insectos de Nicaragua volumen I. Catálogo de los insectos y los artrópodos terrestres de Nicaragua pág. 215.
- Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 62p.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y calidad de hongo entomopatógenos en Nicaragua y Costa Rica. CATIE: Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 9 5 -103,201.Disponible-en-web:
<http://www.bionica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

- Román, E. 2010. Mosca blanca. Fondo De Fomento Algodonero. Recopilación hecha por I.A. Esp. Disponible en web:
<http://www.conalgodon.com/sites/default/files/Manejo%20integrado%20de%20Mosca%20Blanca.pdf>
- Sediles, A. 2000. Informes Nacionales, Informe Nicaragua. Departamento de Producción Agrícola y Forestal, Universidad Nacional Agraria (UNA). Pág. 18. Disponible en Web:
<http://207.248.177.30/mir/uploadtests/17849.66.59.20.B%20argentifolii%20en%20M%C3%A9xico.pdf>

X. Anexos

10.1. Resultado de conteo de conidias

Formula:

$$X * 25 * 4 * 10^6 * \text{volumen de la dilución}$$

$$15.3 \times 25 \times 260\text{ml} \times 1000000 = 9.9450000000 = 9 \times 10^{10} \text{ c/ml}$$

10.2. Prueba de viabilidad

Formula:

$$X = \text{Conidias germinadas} \div \text{total de conidias} \times 100$$

$$X = 720 \div 763 \times 100 = 94.36\%$$

10.3. Porcentaje de esporulación

Formula:

$$X = \text{Total de moscas espatuladas} \div \text{Total de moscas muertas} \times 100$$

$$X = 1187 \div 1282 \times 100 = 92\%$$

10.4. Tabla de Mortalidad y esporulación.

Tabla 1. Numero de moscas muerta por día en tres repeticiones

Días	3	5	7	9	11	13	15	17	Total
Repeticón 1	21	39	49	54	81	71	53	43	411
Repeticón 2	27	42	66	66	80	61	45	47	434
Repeticón 3	22	43	54	63	85	64	53	53	437
									1282

Tabla 2. Numero de moscas esporuladas por día en tres repeticiones

Días	3	5	7	9	11	13	15	17	Total
Repeticón 1	13	30	41	47	65	61	61	67	385
Repeticón 2	23	29	40	43	48	70	73	76	402
Repeticón 3	22	34	38	46	64	56	69	71	400
									1187

10.5. Imágenes tomadas en el momento de la investigación



Foto 1. Recolección de insectos en cultivo de Cucurbitaceae



Foto 2. Observación de Mosca Blanca por Estereoscopio



Foro 3. Montaje de Bioensayo



Foto 4. Montaje de Bioensayo



Foto 5. Día 3 de observación midiendo la esporulación

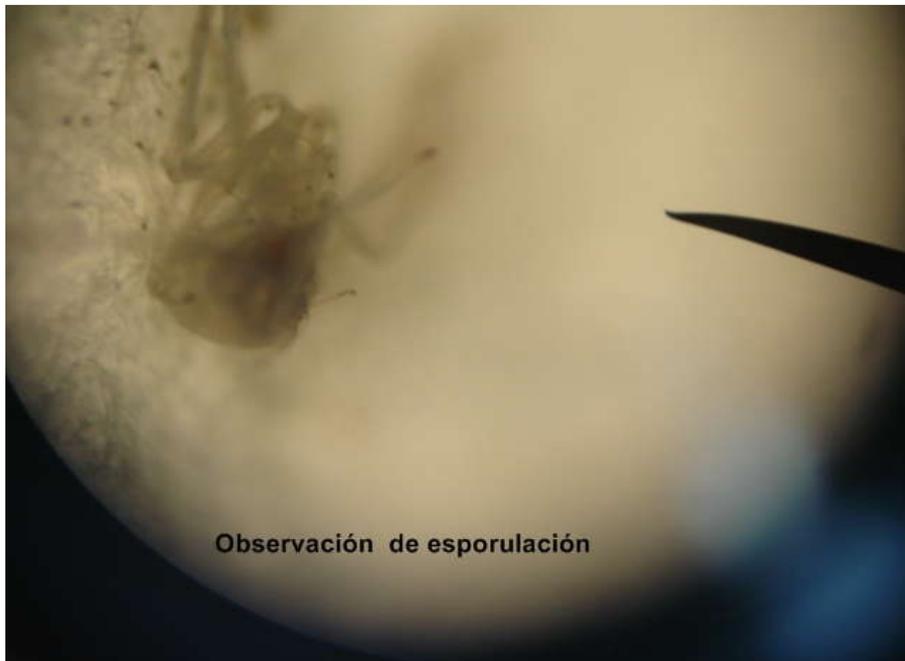


Foto 6. Día 5 de observación midiendo la esporulación



Foto 7. Día 7 de observación midiendo la esporulación

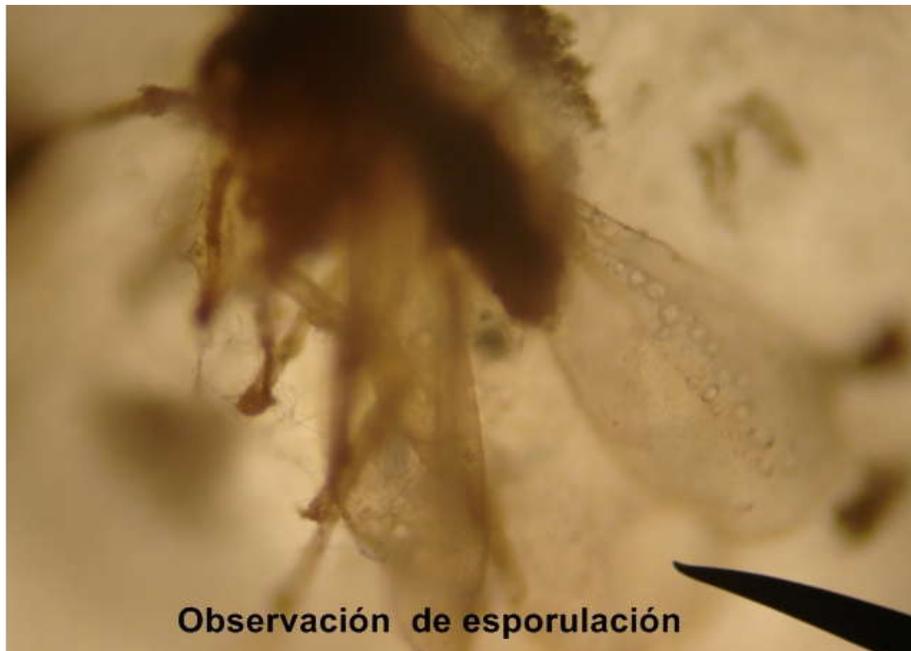


Foto 8. Día 9 de observación midiendo la esporulación

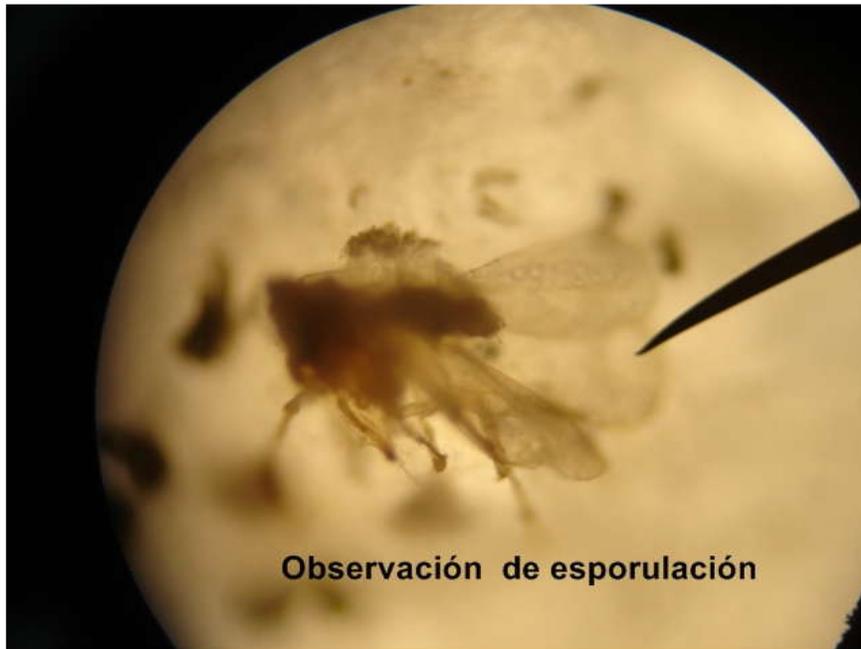


Foto 9. Día 11 de observación midiendo la esporulación



Foto 10. Día 13 de observación midiendo la esporulación



Foto 11. Día 15 de observación midiendo la esporulación

