

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



INGENIERIA AGROPECUARIA

INFORME DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA DE PROYECTO

Eficacia de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, en el control de ninfas de *Mahanarva andigena* (Jacobi), en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) bajo condiciones de laboratorio.

AUTOR

Edison Patricio Carreño Alarcón

DIRECTOR

Dr. Segundo Valle Ramírez, PhD.

CIUDAD

PUYO- PASTAZA-ECUADOR

2016

DECLARACION DE AUTORIA

Yo, Carreño Alarcón Edison Patricio, con cedula de ciudadanía No. 1400750970, por medio del presente declaro, ante el Tribunal Académico de esta Universidad, que el trabajo de investigación es de mi autoría y que no contiene material escrito por otra persona al no ser el referenciado debidamente en el texto, parte de ella o en su totalidad no ha sido aceptada para el otorgamiento de cualquier otro diploma de una institución nacional o extranjera.

La UEA, puede hacer uso de los derechos correspondientes al mismo, según lo establecido por la ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la Normativa institucional vigente.

Carreño Alarcón Edison Patricio

AUTOR

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado y culminado por el Señor Carreño Alarcón Edison Patricio, egresado de la Escuela de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Estatal Amazónica, bajo mi supervisión.

Dr. Segundo Valle Ramírez, PhD.

DIRECTOR DE PROYECTO

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

M.Sc. Sandra Soria Re.

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

M.Sc. Bélgica Yaguache.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Reinaldo Aleman. PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS por darme la vida y haberme permitido llegar hasta este nivel y por sus infinitas bendiciones cada día.

A mis padres por su grande amor y apoyo incondicional durante todo el periodo de preparación profesional.

A mi Esposa e hijo por ser una parte importante de mi vida, por su apoyo y aliento para luchar cada día.

Al Dr. Segundo Valle director de proyecto, el cual con su experiencia y apoyo, ha sido la guía idónea y fundamental para la culminación de este proceso de preparación profesional.

DEDICATORIA

A DIOS por guiarme por el buen camino, “soy lo que soy por su gracia y misericordia”.

A MIS PADRES, ESPOSA E HIJO y AMIGOS que con su apoyo y ejemplo han hecho de mí una persona con valores y fuerza para poder desenvolverme como esposo, padre y profesional.

RESUMEN

En la provincia de Pastaza el salivazo *Mahanarva andigena* constituye la principal plaga del cultivo de la caña de azúcar, cultivar POJ93 (limeña), por las grandes afectaciones que ha producido en los rendimientos agrícolas y calidad de la panela. Sin embargo, hasta la presente fecha se disponen de escasos estudios relacionados con el control biológico de ninfas de este insecto plaga mediante la utilización aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en las condiciones agroecológicas del cantón Pastaza. El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la evaluación de algunas características morfológicas y fisiologías de cuatro aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre cuatro medios de cultivo y la verificación de la eficacia de estos aislamientos en el control de ninfas de *M. andigena* bajo condiciones de laboratorio. Para evaluar las características morfológicas se empleo un diseño completamente aleatorio con 16 tratamientos, donde se evaluaron características culturales, tamaño de colonia, tasa de crecimiento y producción de conidios. Para la verificación de la eficacia de los aislamientos en el control de ninfas se realizó mediante un diseño completamente aleatorio con cinco tratamientos (cuatro aislamientos nativos y el tratamiento control) y cinco réplicas. Cada replica se conformó con 10 ninfas por cada placa de Petri, con un total de 50 ninfas por tratamiento. Se evaluó la mortalidad total, la mortalidad corregida y la mortalidad confirmada. Los cuatros aislamientos nativos presentaron características morfológicas similares y de ellos los aislamientos MT-51(01) y T-63(01) presentaron la mayor producción de conidios en el medio de cultivo PDA modificado, con valores de 8,21 y $7,90 \times 10^6$ conidios.cm⁻². Los aislamientos nativos MT-51(01) y P-50(01) de *M. anisopliae* provocaron altos porcentajes de mortalidad confirmada con valores que estuvieron entre 71 y 65%, respectivamente. De estos el aislamientos nativos MT-51(01) es el más promisorio para su validación en campo.

ABSTRACT

In the province of Pastaza, the spittle *Mahanarva andígena* is the main crop pest of sugarcane, POJ93 cultivar (limeña) , by Major affectations that has produced in agricultural yields and quality of panela. However, until the present date, few studies have related to the biological control of insect nymphs of this pest by using native isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in agro-ecological conditions of the canton Pastaza. This study aimed the evaluation of some morphological characteristics and physiologies four native isolates of *M. anisopliae* on four culture media and verifying the effectiveness of these isolates in controlling nymphs of *M. andígena* under laboratory conditions. To evaluate the morphological characteristics use a completely randomized design with 16 treatments, where cultural characteristics, colony size, growth rate and production of conidia were evaluated. For verification of the effectiveness of the isolates in the control of nymphs was performed using a completely randomized design with five treatments (four native isolates and control treatment) and five replicates. Each replica was formed with 10 nymphs per Petri dish, with a total of 50 nymphs per treatment. Total mortality was assessed, mortality corrected by Abbott's formula modified and mortality confirmed. The four native isolates had similar morphologic features and MT- 51(01) including insulation and T-63 (01) had the highest production of conidia on PDA culture medium modified with values 8.21 and 7,90x10⁶ conidia. cm⁻² . Isolates native MT- 51 (01) and P- 50(01) of *M. anisopliae* caused high mortality rates were confirmed with values between 71 and 64%, respectively.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción	2
1.1. Hipótesis de trabajo:.....	3
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.	5
2.1. La Caña de azúcar.	6
2.2. Taxonomía de la caña de azúcar.	6
2.3. Distribución global de la caña de azúcar.....	7
2.4. Caña de azúcar en el Ecuador.	7
2.5. Producción de caña en la provincia de Pastaza.....	8
2.6. Principales plagas de la caña de azúcar.	8
2.6.1. El salivazo, <i>Mahanarva andigena</i> (Jacobi) (Hemiptera: Cercopidae).	9
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	19
3.1. Localización	20
3.2. Tipo de Investigación.....	20
3.3. Métodos de Investigación.....	20
3.4. Diseño de la Investigación.....	20
3.4.1. Evaluar la tasa de crecimiento y producción de conidios de los aislamientos nativos del hongo <i>M. anisopliae</i> en cuatro medios de cultivo.	20
3.4.2. Determinar la eficacia de cuatro aislamientos nativos del hongo <i>M. anisopliae</i> en el control de ninfas de <i>M. andigena</i>	22
3.4.3. Elaborar una propuesta para la incorporación de <i>M. anisopliae</i> en el control biológico de ninfas de <i>M. andigena</i> en condiciones de campo.	24
3.5. Tratamiento de Datos.	24
3.6. Materiales.	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Caracterización morfológica de los aislamientos nativos del hongo <i>M. anisopliae</i> en diferentes medios de cultivo.	27
4.2. Eficacia de aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> en el control de ninfas de <i>M. andigena</i> en condiciones de laboratorio.	30
4.3. Propuesta para la incorporación de <i>M. anisopliae</i> en el control biológico de ninfas de <i>M. andigena</i> en condiciones de campo.....	33

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
5.1. Conclusiones.	36
5.2. Recomendaciones.....	36
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	37
6.1. Referencias Bibliográficas.	38
CAPÍTULO VII: ANEXOS.....	43
7.1 Anexos	44

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Introducción

El ataque de insectos plaga constituye una de las principales causas en la disminución del rendimiento agrícola e industrial de la caña de azúcar. En Ecuador, existen varias especies de insectos que pueden afectar el cultivo, entre los más importantes se encuentran el saltahojas, *Perkinsiella saccharicida* (Kirkaldy) y el salivazo *Mahanarva andigena* (Jacobi (Mendoza, 2001). Esta última especie ha provocado la reducción de la productividad de los tallos de caña de azúcar y la calidad de la materia prima para el proceso industrial, a nivel de Ecuador se reportan pérdidas entre el 15 y 34% en la obtención de sacarosa (Mendoza *et al.*, 2004).

Como una alternativa para disminuir y controlar el efecto de este insecto plaga, los productores de caña de azúcar han recurrido al uso de insecticidas químicos, como única opción de control. Lo que ha traído como consecuencia la ruptura del equilibrio biológico del agro-ecosistema, con manifestaciones evidentes de resurgencia de plagas claves, surgimiento de nuevas plagas, y problemas relacionados con la salud y el medio ambiente (Mendoza, 2001).

En función de esto, se generó un gran interés en la utilización de hongos entomopatógenos para el control biológico de insectos plagas (Schapovaloff, 2012). Así mismo, Motta y Murcia (2011) señalaron que estos hongos presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde muestran importantes servicios ecosistémicos en la producción agrícola debido a que pueden eliminar o mantener las plagas bajo el umbral de daño económico.

Los hongos entomopatógenos son comunes y generalmente atacan a casi todas las clases de insectos, hasta la fecha existen alrededor de 750 especies de hongos de unos 90 géneros que han sido documentados como patógenos, pero solo unas pocas de estas especies actualmente están siendo desarrolladas como patógenos contra las plagas de insectos (Rai *et al.*, 2014). Entre estas especies se encuentra *Beauveria bassiana* (Bals), *Verticillium lecani* (Zimmerman) y *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Sivakalai y Ramanathan, 2015).

De las especies mencionadas *M. anisopliae* se destaca por ser un hongo que a menudo se encuentra en el suelo y puede causar infección a más de 200 especies de insectos (Chen *et al.*, 2014).

Este hongo es comercialmente desarrollando en diferentes países para el control biológico de plagas agrícolas, especialmente para insectos de la familia *Curculionida*, *Scarabaeidae* y *Cercopidae* (Santos *et al.*, 2011).

En América del Sur este hongo está siendo utilizado ampliamente para el control biológico del salivazo en caña de azúcar y en pastos (Ramanujam *et al.*, 2014). Por ejemplo, Freitas *et al.*, (2014), al evaluar la eficacia de diferentes aislamientos de este hongo se observaron mortalidades confirmadas por encima del 70%.

Uno de los cultivos principales en la provincia de Pastaza es la producción de caña de azúcar, la cual ha sido afectada por el salivazo *M. andigena*, convirtiéndose en un problema para la producción de este cultivo, afectando significativamente a la economía de los productores de la zona. Sin embargo hasta la presente fecha no se dispone de suficientes estudios realizados en las condiciones específicas de la provincia de Pastaza que confirmen la eficacia de *M. anisopliae* en el control de ninfas de *M. andigena*.

En relación a la problemática planteada se estableció la siguiente:

1.1. Hipótesis de trabajo:

La utilización de aislados nativos del hongo *M. anisopliae* permitirá reducir los niveles poblacionales de ninfas *M. andigena* en el cultivo de caña de azúcar.

Para dar cumplimiento a la anterior hipótesis, se planteó como:

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la eficacia de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* en el control de ninfas de *Mahanarva andigena* (Jacobi), en la caña de azúcar (*Saccharu officinarum* L.) en condiciones de laboratorio.

1.2.2. Objetivos Específicos

2. Evaluar la tasa de crecimiento y producción de conidios de los aislamientos nativos del hongo *M. anisopliae* en cuatro medios de cultivo.
3. Determinar la eficacia de cuatro aislamientos nativos del hongo *M. anisopliae* en el control de ninfas de *M. andigena* en condiciones de laboratorio
4. Elaborar una propuesta para la incorporación de *M. anisopliae* en el control biológico de ninfas de *M. andigena* en condiciones de campo.

CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.

2.1. La Caña de azúcar.

La caña de azúcar *Saccharum officinarum* L., es una antigua fuente de energía para los seres humanos, y en épocas más recientes, fue empleada por primera vez en el Sudeste Asiático y en la India Occidental como reemplazo del combustible fósil para vehículos a motor. Alrededor del año 327 A.C. la caña de azúcar era un cultivo importante en la India. Fue introducida en Egipto aproximadamente en 647 D.C. y, casi un siglo más tarde, sería introducida en España (755 D.C.) (NETAFIN, 2010).

2.2. Taxonomía de la caña de azúcar.

La caña de azúcar se clasifica botánicamente de la siguiente forma de acuerdo a Bustamante (2015).

Reino: Vegetal

Tipo: fanerógamas

Subtipo: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Glumales

Familia: Poáceas

Tribu: Andropogoneas

Género: *Saccharum*

Especie: *Spontaneum* y *robustum* (silvestre), *edule*, *barberi*, *sinense* y *officinarum* (doméstica).

A demás, este mismo autor señala que *S. officinarum* corresponde a las cañas que conocemos actualmente y que son cultivadas hoy en día, y se cree que esta fue domesticada por medio de *S. robustum*. Estas especies mencionadas poseen sus propias características que le identifican de manera diferenciada y específica. La cantidad de cromosomas es diferente en cada especie, por lo cual ha incidido en una variación genética amplia en sus progenies, cuando se han utilizado en cruces entre las especies.

2.3. Distribución global de la caña de azúcar.

La caña de azúcar ocupa un área de 20,42 millones de hectáreas en todo el mundo, con una producción total de 1 333 millones de toneladas métricas (FAO, 2003).

El área cultivada con caña de azúcar y la productividad difieren considerablemente de un país a otro. Brasil tiene la mayor área (5 343 millones de ha), mientras que Australia tiene la mayor productividad promedio (85,1 ton.ha⁻¹). De los 121 países productores de caña de azúcar, 15 países (Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán, México, Cuba, Colombia, Australia, USA, Filipinas, Sudáfrica, Argentina, Myanmar, Bangladesh) concentran el 86,0% del área y el 87,1% de la producción mundial. Del total de producción de azúcar blanca cristalizada, aproximadamente el 70% proviene de la caña de azúcar y un 30% proviene de la remolacha azucarera (NETAFIN, 2010).

2.4. Caña de azúcar en el Ecuador.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2011), en nuestro país, la superficie destinada para la producción de la caña de azúcar fue de 94 835,00 hectáreas, de las cuales se produjeron 8 131 819,00 toneladas métricas (Tm) y se vendieron 5 957 208,00 (Tm). Además, señalaron que al realizar el análisis de la producción desde el año 2007 hasta el 2011, determinaron que el mejor año tanto para la producción como para las ventas fue el 2008, donde se produjeron 9 341 099,00 (Tm) y se vendieron 8 496 482,00 (Tm). Así mismo, informaron que su disminución pudo darse por el cambio climático, escases de mano de obra, altos costos, problemas de cosecha y otros factores en las plantaciones.

Ecuador cuenta con seis instalaciones procesadoras de caña de azúcar, las más grandes y tradicionales cubren el 90% de la producción Nacional, entre éstas se encuentran: San Carlos, Valdez, La Troncal, Isabel María, IANCEM y Monterrey. Estas dos últimas trabajan en producción durante todo el año por estar ubicadas en la sierra, mientras que las otras solo en determinadas épocas del año. La superficie sembrada para la producción de la caña de azúcar se encuentra distribuida en las siguientes provincias: el 72,4% en el Guayas, 19,60% en el Cañar, el 4,20% en el Carchi e Imbabura, el 2,4% en Los Ríos, y el 1,40% en Loja (INEC, 2011).

2.5. Producción de caña en la provincia de Pastaza.

La provincia de Pastaza cuenta con organizaciones y pequeños productores que cuentan con sus propios terrenos y cultivos de caña de azúcar. Más allá de estos recursos es importante indicar que las organizaciones y productores cuentan con equipos e insumos limitados para desarrollar plenamente estas actividades, lo cual deja como consecuencia la baja productividad.

Los cañicultores de Pastaza se encuentran organizados a nivel de diferentes organizaciones entre estas se encuentran la ASOCAP, APALA, TENIENTE HUGO ORTIZ, JUAN DE VELAZCO, EL CAÑAVERAL, CAJABAMBA, APROCAT, FÁTIMA, YANTANA, JATUNPACHA, MUSHUKWARMÍ y SAN JACINTO.

En relación a la superficie en producción, en la provincia de Pastaza existe alrededor de 1 324 hectáreas de monocultivo (GADPPz, 2010).

2.6. Principales plagas de la caña de azúcar.

En algunos países, las plagas y las enfermedades de la caña de azúcar han sido la causa de pérdidas significativas en la producción e incluso de desastres económicos en este sector agro-industrial. A nivel mundial, se reportan alrededor de 1500 especies de insectos perjudiciales y más de 200 enfermedades que atacan a la caña de azúcar, cuya distribución e importancia varía en las diversas regiones geográficas en que se cultiva esta gramínea. En el Ecuador, hasta ahora, se han identificados 33 especies de insectos plagas, dos especies de roedores y 15 enfermedades, de las cuales solo unas pocas revisten importancia económica en la zona azucarera de la cuenca baja del Río Guayas. Varias de estas plagas o enfermedades son nativas y se han adaptado eficientemente a la caña de azúcar, otras han sido introducidas incidentalmente a través de material de propagación vegetativa. (Mendoza y Garcés, 2013).

Entre las principales especies de insectos plagas de la caña de azúcar se encuentran el Saltahojas (*Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy), el barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*), el áfido amarillo (*Sipha flava* Forbes), el picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) y el salivazo *Mahanarva andigena* (Mendoza *et al.*, 2013).

Según el GADPPz (2010) en la provincia de Pastaza, entre las principales plagas que se encuentran afectando al cultivo de caña de azúcar se encuentra *M. andigena* con el 68% de afectación, picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) con el 18% de afectación y las termitas (comején) con el 14% de afectación.

2.6.1. El salivazo, *Mahanarva andigena* (Jacobi) (Hemiptera: Cercopidae).

El salivazo, *M. andigena* es un insecto plaga importante de la caña de azúcar en varias regiones del país, particularmente en la Cuenca Baja del Guayas (Naranjito, Milagro, Bucay), Zaruma, Piñas (El Oro), Puyo (Pastaza) y Nanegalito (Pichincha). Se considera una especie nativa de pastos y malezas gramíneas que se ha adaptado eficientemente a la caña de azúcar (CINCAE, 2015).

La clasificación taxonómica de *Mahanarva andigena* es la siguiente de acuerdo al reporte de identificación de AGROCALIDAD (2014)

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Sub orden: Auchenorrhyncha (Alves y Carvalho, 2014)

Familia: Cercopidae

Género: *Mahanarva*

Especie: *Mahanarva andigena*

Según Umul (2000), el daño causado por este insecto plaga puede dividirse en dos tipos: el daño provocado por la ninfa al alimentarse de las raíces y tallos de la planta, y el daño provocado por el adulto al alimentarse de retoños y hojas. Las manchas de color amarillo blancuzco que aparecen en las hojas son un síntoma de la infestación de este insecto, lo que ocasiona una seria disminución en el área disponible para la fotosíntesis y en la productividad de los cañaverales (Thompson y León, 2005). Este insecto introduce toxinas en las hojas al perforarlas y succionar sus jugos. Las áreas dañadas de la hoja se secan gradualmente, y si la infestación es grave, las lesiones se fusionan y finalmente grandes porciones de la hoja mueren (Ortega, 1987).

El salivazo es la plaga más perjudicial en caña de azúcar. Esta plaga puede llegar a provocar reducciones significativas hasta del 60% en los rendimientos (Bayer, 2010). En Ecuador, en el ingenio San Carlos, en los años 1999 y 2000, se registraron pérdidas de sacarosa de 15, 17 y 34 %, en las variedades B76-78, Ragnar y NCo-310, respectivamente (Mendoza *et al.*, 2013).

Estos mismos autores, señalan que a más de la caña de azúcar, existen otras especies de pastos y malezas poáceas que son hospederos importantes tales como el gramalote (*Paspalum fasciculatum*), pata de gallina (*Eleusine indica*), paja mona (*Leptochloa filiformis*), cola de zorro (*Setaria geniculata*), pasto Johnson (*Sorghum halepense*), cauca (*Panicum maximum*), pasto morado (*Echinochloa colonum*) y pasto janeiro (*Eriochloa polystachya*).

2.6.1.1. Descripción morfológica y ciclo de vida del salivazo

El ciclo de vida de este insecto comprende tres estados de desarrollo: huevo, ninfa y adulto.

Huevo

Los huevos son muy pequeños, difíciles de observar a simple vista, tienen forma de granos de arroz muy diminutos. Son insertados en los extremos laterales de la base de vainas de hojas viejas que se encuentran adheridas a lo largo del tallo. Los huevos recién ovipositados son de color blanco-cremoso, posteriormente se tornan de color amarillo con una mancha oscura en uno de los costados y extremo del huevo, que corresponde al opérculo del mismo. Cuando están próximos a la eclosión se observan unos puntos rojizos que corresponden a los ojos y manchas que presentan en el abdomen las ninfas recién eclosionadas. Los huevos son de forma ahusada o fusiforme y miden aproximadamente 1,3 mm de largo por 0,4 mm de ancho, son puestos individualmente o en grupos irregulares. El periodo de incubación es de 16 a 18 días, existiendo una fertilidad del 90 por ciento. (CINCAE, 2013).

Según Rodríguez y Peck (2007), los huevos de *M. andigena* pasan por cuatro fases de desarrollo. En la fase S1, los huevos presentan una tonalidad crema, sin ninguna característica externa. La fase S2 se caracteriza por la aparición de una mancha roja ubicada debajo de la sutura de eclosión. Para la fase S3 establecieron la apertura de la

sutura de eclosión como característica externa y para la fase S4, como característica externa adicional, la presencia de las manchas oculares y abdominales.

Ninfa

Las ninfas recién eclosionadas se dirigen hacia el cogollo, donde se localizan alimentándose de la savia y permaneciendo cubiertas de una masa espumosa que ellas elaboran (CINCAE, 2013). De acuerdo a Rodríguez *et al.* (2002), las ninfas pasan por cinco instares absolutamente distinguibles, al igual que otras especies, por el incremento significativo en el tamaño de los parámetros físicos que acompañan la muda. El ancho de la cápsula cefálica es la característica morfológica más distintiva para separar los instares.

Según el CINCAE (2013), las ninfas de los primeros instares se localizan en el cogollo y las ninfas del último instar en el tallo, debajo de las vainas viejas. Además, determinaron que la duración del periodo ninfal varía de 30 a 40 días, bajo condiciones de laboratorio a temperatura de 24 ± 4 °C y $82\pm 10\%$ de humedad relativa.

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 (Castillo, 2006).

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 provisto de dos cerdas. Las alas anteriores son más gruesas que las inferiores, tienen un color café oscuro y en algunas especies las atraviesan dos bandas transversales de color amarillo claro, las alas inferiores son membranosas. Las patas son de color oscuro, el abdomen está formado por nueve segmentos visibles, los dos primeros se encuentran reducidos (Rodríguez, 2003).

En su estado adulto, el salivazo es un insecto de tamaño mediano, existiendo una marcada diferencia entre el macho y la hembra. El macho mide aproximadamente 11 mm de largo y

5 mm de ancho, de coloración castaño oscuro o negro con manchas amarillas bien acentuadas sobre las alas anteriores a manera de dos bandas transversales, el abdomen y las patas son rojizos. La hembra es ligeramente mayor que el macho (13 mm de largo y 6,5 mm de ancho), de color castaño, con las manchas amarillas un poco difusas. Los adultos permanecen durante el día en el follaje de las plantas, particularmente en las hojas más cercanas al cogollo o dentro de él. Esto último es más común en las horas de mayor luminosidad (Mendoza *et al.*, 2004).

2.6.1.2. Patrones de comportamiento y distribución espacial del salivazo

Las ninfas del salivazo permanecen estáticas y cubiertas de espuma que se localizan en las raíces y tallos de las plantas. Los adultos tienen vida libre y buena capacidad de movilidad, son malos voladores y se desplazan principalmente mediante saltos. Su mecanismo de defensa es la habilidad de saltar y la autohemorragia (Peck, 2003; 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 período lluvioso, apareciendo picos de ninfas y adultos de manera escalonada y superpuestas. Se pueden presentar muchas generaciones al año si existen condiciones de elevada humedad en el suelo, o cuando existe un mal drenaje (SESA, 2003).

2.6.1.3. Medidas de control del salivazo.

Entre las medidas más importantes para el manejo de esta plaga se encuentran el control cultural, químico y el control biológico.

Control Cultural.

Según el CINCAE (2004), existen algunas labores agrícolas que ayudan a reducir o evitar la incidencia del salivazo, estas labores comprenden:

- Quemar los canteros y los residuos de cosecha.
- Renovar los canteros despoblados y altamente infestados.
- Evitar el movimiento de semilla de lugares infestados a lugares que estén libres de la plaga.
- Controlar las malezas hospederas del salivazo, dentro y fuera del cantero.

- Mantener un buen drenaje del cantero.
- Efectuar el deshoje de hojas bajas para eliminar ninfas medianas y grandes.

Control Químico.

Cuando no se dispone de un producto biológico, y en las áreas donde la incidencia de la plaga supere el umbral de daño económico, habrá que recurrir al uso de insecticidas, lo cual debe basarse en un sistema eficiente de muestreo (CINCAE, 2004).

Teixeira (2010), señala que el control químico es una herramienta bastante valiosa en un programa de manejo del salivazo, especialmente en cañaverales severamente atacados y hasta el momento, los productos sistémicos han mostrado una alternativa bastante eficiente. En Ecuador, de acuerdo a Mendoza *et al.* (2005), los insecticidas químicos que han mostrado un eficiente control de *M. andigena* en los cañaverales de la costa ecuatoriana han sido el Sevín 80 PM (Carbaryl) en dosis de 1,0 a 1,5 kg.ha⁻¹ y Orthene 75 PS (Acefato) en dosis de 750 g.ha⁻¹.

Control Biológico.

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, principalmente en los chupadores o succionadores. Entre estos, se encuentra el hongo *Metarhizium anisopliae* que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes, entre las plagas afectadas se encuentra el salivazo de la caña de azúcar. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Sandino, 2003).

En el Ecuador, el CINCAE (2004) informó que se han observado varios enemigos naturales que ejercen un buen control del salivazo. Entre estos se encuentra el hongo *Batkoa* (=Entomophthora) sp. (Zigomycetes, Entomophthorales), capaz de causar hasta el 90% de mortalidad de adultos, el sírfido *Salpingogaster* sp Schin. (Díptera: Syrphidae), la tijereta *Doru lineare* (Dermaptera: Forficulidae), y la hormiga *Camponotus* sp., que son depredadores de ninfas. Otros enemigos naturales son las arañas, aves (golondrinas) y sapos.

Además, este mismo autor señala que el uso de *Metarhizium anisopliae*, aún se encuentra en una fase de desarrollo, existiendo buenas perspectivas para su utilización en los programas de manejo de esta plaga, especialmente durante la época lluviosa. No obstante, de acuerdo a estudios preliminares recomiendan una dosis de 1×10^{13} conidias.ha⁻¹ (2 a 3 kg de arroz-hongo por hectárea).

De acuerdo a Sung *et al.* (2007) y Humber (2012) la clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi (Hongos verdaderos)

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes filamentosos

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metacodyceps* Sung *et al.* (2007)

Especie: *M. taii* (Liang y Liu) Sung *et al.* (2007)

Estado anamorfo: *Metarhizium anisopliae sensu lato*

(Metsch) Sorokin

Modo de acción de *Metarhizium anisopliae*

Este hongo penetra a través de la cutícula del insecto hospedante. La enfermedad causada por el hongo es conocida como enfermedad de la muscardina verde debido al color verde de sus conidios. La interacción entre el patógeno y el hospedante está influenciado por diferentes factores como la producción de enzimas, temperatura ambiental, humedad, luz y radiación ultravioleta, sí como, las condiciones nutricionales y susceptibilidad del hospedante (Rustiguel *et al.*, 2012).

Según Faria y Wraight (2007), el desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto.

1) Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación de la espora

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteíca en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini *et al.*, 2007).

La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas pos inoculación (Vicentini y Magalhaes, 2010).

El proceso de adhesión de la espora a la cutícula del insecto, está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas. En el entomopatógeno *Metharizium anisopliae* se ha descrito un tipo de adhesina denominada MAP1 la cual se localiza en la superficie de los conidios (Wang *et al.*, 2007).

2) Penetración en el hemocele

La forma en que el hongo entomopatógeno penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992).

Una vez establecido el proceso de adhesión, continúa la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos: físico y químico. El primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001).

3) Desarrollo del hongo

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, 2001).

Según Lecuona (2009), en las ninfas infectadas por *M. anisopliae* disminuye sus movimientos, la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. En los adultos infectados presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras no ovipositan, el ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días, después de la muerte, los individuos presentan un crecimiento micelial blanco seguido por la típica esporulación verde, en algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación.

Los insectos muertos por *Metarhizium anisopliae* son cubiertos completamente por un micelio de color blanco, el cual se torna de color verde cuando el hongo esporula. El inoculo inicial proviene de las aplicaciones del hongo o de propágulos del patógeno que sirven para contaminar las primeras ninfas o adultos, el inicio de la enfermedad en los insectos se presenta con la migración de adultos contaminados en los cuales después de muertos ocurre la esporulación del hongo, siendo los conidios dispersados por el agua de lluvia, rocío o viento hacia otras partes de la planta, principalmente las inferiores, esto permite que las ninfas en su trayecto de búsqueda o cambio de sitio de alimentación se expongan a la contaminación del hongo, la fase ninfal del salivazo es más susceptible al entomopatógeno teniendo mayores oportunidades de contaminación, a partir de aquí se forman los focos secundarios y como consecuencia, la enfermedad tiene carácter epizootico atacando a la población del salivazo (Corral, 2006).

Factores que influyen en la efectividad de los hongos entomopatógenos.

Los factores ambientales cumplen una función esencial en la iniciación y desarrollo o en la prevención y supresión de las epizootias naturales afectando las condiciones fisiológicas del hospedante, su densidad y distribución espacial, y temporal, siendo los más estudiados

la temperatura, humedad relativa, radiación solar, suelo y uso de agroquímicos (Schapovaloff, 2012).

Humedad Relativa.

Según Schapovaloff (2012), la humedad relativa es un factor de gran importancia, tanto para el hospedante como para el patógeno, principalmente sobre la germinación, penetración y para la reproducción del hongo, una falta de humedad relativa adecuada puede perjudicar una epizootia. Además, señala que con un nivel de humedad relativa del 100% la esporulación ocurre en cuatro días, pero a una humedad relativa de 92,5% ocurre a los cinco o más días, mientras que la esporulación es inhibida con humedad relativa menor del 90%.

Temperatura.

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes debido a que puede afectar la germinación de las esporas, desarrollo, penetración del tubo germinativo, colonización y reproducción de los hongos entomopatógenos. Los requerimientos térmicos de los hongos entomopatógenos son variables en función de la especie, cepa y fase de desarrollo. El rango óptimo para el desarrollo de *Metarhizium anisopliae* se encuentra entre 25 y 30 °C, a temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 35 °C la esporulación es inhibida (Sosa y Alves, 2000).

Radiación Solar.

Para evaluar el efecto de la radiación solar sobre los patógenos y sobre la ocurrencia de las enfermedades es necesario considerar los siguientes aspectos: espectro de luz visible con sus diferentes longitudes de onda (luz verde, amarilla, azul, etc.), foto período y faja de luz ultravioleta germicida, la exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidias. El crecimiento y esporulación de los hongos es retrasado por la radiación solar y que la nubosidad tiene un papel importante en el desarrollo de las epizootias causadas por hongos entomopatógenos (Schapovaloff, 2012).

Suelo.

El suelo puede abrigar tanto a los insectos como a los entomopatógenos y es un ambiente complejo donde los microorganismos sufren la acción de los factores bióticos y abióticos, que dan como resultado una mayor o menor permanencia de acuerdo a las condiciones de campo, los hongos entomopatógenos pueden vivir en el suelo por periodos variables. *M. anisopliae* después de parasitar insectos puede permanecer colonizando por un período relativamente largo a la espera de un nuevo hospedante, la mayor parte de sus conidios difícilmente conseguirán sobrevivir por más de tres meses en los diferentes tipos de suelo (Schapovaloff, 2012).

Los agroquímicos y su efecto sobre los entomopatógenos.

La susceptibilidad de los entomopatógenos a los agroquímicos puede variar de acuerdo con el grupo y cepa del patógeno, con la naturaleza química del producto y con la dosis empleada. Existen sustancias que son letales para los microorganismos, otras poseen efecto fungistático o bacteriostático y finalmente, productos que en dosis normales y/o subletales pueden favorecer su crecimiento, reproducción y virulencia. Esto demuestra la importancia de conocer la acción de los agroquímicos sobre las diferentes fases del desarrollo de los entomopatógenos (Schapovaloff, 2012).

La principal causa de la incompatibilidad entre estos agentes es que el producto químico afecta de alguna forma el desarrollo del patógeno, inhibiendo la germinación de los conidios de forma temporal o permanente (Pavone y Dorta, 2010).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

Los experimentos se ejecutaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en la ciudad del Puyo provincia de Pastaza. En el laboratorio la temperatura fue controlada a 24°C y una humedad relativa del 85%.

Las condiciones climáticas de la provincia de Pastaza, donde se desarrolló el ensayo es cálido y húmedo, variable según los pisos climáticos con precipitaciones promedio de 4 576,14 mm anuales, humedad relativa promedio de 88,30 %, insolación promedio anual de 1 076 horas, temperatura mínima promedio de 15,20 °C, temperatura media promedio 21,24 °C y temperatura máxima promedio de 29,09 °C (INAMHI, 2014).

3.2. Tipo de Investigación.

La presente investigación se desarrolló utilizando un método experimental, bajo condiciones controladas de laboratorio para la obtención de resultados aplicables a la ejecución del proyecto en campo.

3.3. Métodos de Investigación.

Se utilizaron los métodos teóricos: inductivos - deductivos; análisis y síntesis; y el método empírico denominado experimental.

3.4. Diseño de la Investigación.

3.4.1. Evaluar la tasa de crecimiento y producción de conidios de los aislamientos nativos del hongo *M. anisopliae* en cuatro medios de cultivo.

Metodología

Este experimento se organizó bajo un diseño completamente aleatorizado con dieciséis tratamientos (Cuatro aislamientos y cuatro medios de cultivo) y diez réplicas, estos fueron los siguientes: 1-MT-51(01)/SDA, 2-T-63(01)/SAD, 3-P-50(01), 4-F-55(01)/SDA, 5-MT-51(01)/PDA, 6-T-63(01)/PDA, 7-P-(50)/PDA, 8-F-55(01)/PDA, 9-MT-51(01)/AEM, 10-

63(01)/AEM, 11-P-50(01)/AEM, 12-F-55(01)/AEM, 13-MT-51(05)/PDA-MOD, 14-T-63(01)/PDA-MOD, 15-P-50(01)/PDA-MOD y 16-F-55(01)/PDA-MOD.

Se utilizaron los siguientes medios: Saboraud Dextrose Agar (SDA) (Difco), Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco), Malt Extract Agar (AEM) (Difco) y Potato Dextrose Agar (PDA) modificado [(39 g/L de PDA, 4,5 g/L de extracto de levadura (Difco), 4,5 g/L de peptona (Difco) y ácido láctico al 25% adicionando el 1% del volumen a preparar)], de acuerdo con la metodología de García *et al.* (2012) (Anexo 1).

En este experimento se utilizaron cuatro aislamientos nativos de *M. anisopliae* provenientes de la colección de microorganismos entomopatógenos del laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Estos aislamientos se encontraban conservados a -70 °C en forma de conidios, acondicionados en tubos eppendorfs de 2 mL.

Para la ejecución de este ensayo cada aislamiento fue multiplicado colocando una cantidad de 10 µl de suspensión conidial (1×10^6 conidios. ml^{-1}) de cada aislamiento, el cual se ubicó en el centro de una placa de Petri de vidrio (100 mm x 15mm) de diámetro, que contenía Potato Dextrosa Agar (PDA). Posteriormente fueron selladas herméticamente y llevadas a incubación a una temperatura de ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) en total oscuridad por 7 días. Posteriormente se tomaron discos de micelio de 5 mm, los cuales fueron transferidas a placas de Petri que contenían los cuatro medios de cultivo a evaluar, estos discos fueron ubicados en el centro de cada caja de Pétri y posteriormente fueron incubadas a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en total oscuridad.

Las evaluaciones del crecimiento micelial se realizaron cada dos días con una media de dos lecturas del diámetro en dirección horizontal y vertical, medido por el reverso de cada placa de Pétri con un calibrador pie de rey, por un período de 20 días (Xiangqun *et al.*, 2015).

Para el cálculo de la tasa de crecimiento (mm.día^{-1}) de los aislamientos se utilizó la fórmula empleada por Hernández y Herrera (2014):

$$\text{T.C.} = \frac{\text{CL}_2 - \text{CL}_1}{\text{T}_2 - \text{T}_1}$$

Donde:

T.C.= Tasa de crecimiento.

CL₁ = Crecimiento lineal en la primera medición.

CL₂ = Crecimiento lineal, segunda medición.

T₁ = Momento de la primera medición. (2 días)

T₂ = Momento en que se realizó la segunda medición. (20 días)

Para determinar la producción de conidios de cada aislamiento en los diferentes medios, se extrajeron cuatro discos de 5 mm de diámetro de las placas de Pétri de 20 días de desarrollo, las cuales se mezclaron en 10 mL de agua destilada estéril conteniendo 0,01% de Tween 80, según metodología de Obando *et al.* (2013). Posteriormente, se contabilizó en cámara Neubauer improved (Boeco) el número de conidios. Para estimar la concentración de conidios se contaron cinco cuadros del cuadrante central de la cámara. El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente aleatorio con seis conteos por aislado y la variable respuesta fue el número de conidios.mL⁻¹.

Conjuntamente se evaluaron características morfológicas como el color (se utilizó la tabla de colores de Munsell), textura y borde de la colonia.

3.4.2. Determinar la eficacia de cuatro aislamientos nativos del hongo *M. anisopliae* en el control de ninfas de *M. andigena*.

Preparación del inóculo.

Todos los aislamientos nativos se multiplicaron en medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA) modificado (García *et al.*, 2012), en placas de Pétri, y cuando presentaron esporulación se procedió a realizar un raspado con un asa metálica estéril para preparar una suspensión madre acuosa con 10 mL de agua destilada estéril+Tween 80 al 0,1% (v/v). Luego se homogeneizaron en un vórtex, una vez homogenizada se procedió a realizar la inoculación de las bolsas plásticas (empaques de polifan de 8 x 12 pulgadas) que contendrán 400 g de arroz precocido, Según la metodología referida por Gómez y Mendoza (2004). A los 20 días de la inoculación de las bolsas se realizó la cosecha de las conidias crecidas sobre el sustrato a base de arroz precocido. Para lo cual, se tomaron cuatro muestras de 1 g de arroz-hongo de cada lote y se colocaron en 9 mL de agua destilada estéril con 0,1% de Tween 80. A partir de esta suspensión se ejecutaron diluciones seriadas en base 10, hasta 10⁻² para cuantificar su concentración en una cámara Neubauer improved (Boeco) para ello se contaron cinco cuadros del cuadrante central de la

cámara sobre microscopio óptico con objetivo 40X, y las pruebas de viabilidad se realizó con la dilución 10^{-3} , usando la técnica de la laminilla con Agar-agua (Gómez y Mendoza, 2004).

A partir de la concentración obtenida, se realizaron los ajustes mediante la fórmula volumétrica $V_1C_1=V_2C_2$ para obtener una concentración 1×10^8 conidias.mL⁻¹ para la inoculación de las ninfas (Tiago *et al.*, 2011; Valle, 2015).

Colecta de ninfas de *Mahanarva andigena*.

Las ninfas fueron colectadas de un cultivo de caña de azúcar de la parroquia Teniente Hugo Ortiz del cantón Pastaza, provincia de Pastaza, Ecuador, libre de aplicaciones con productos fitosanitarios químicos. Después de la colecta con ayuda de un pincel, las ninfas (de tamaño de 8 a 10 mm de longitud) se colocaron en el interior de cajas de isopor conteniendo hojas de caña de azúcar y transportadas para el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, se colocaron 10 ninfas del mismo tamaño en el interior de cada placa de Petri (100 x 15 mm) que contenía una hoja de caña de 8 cm de longitud, lavada con agua destilada estéril y envuelta por los extremos en un pedazo de algodón humedecido con agua (Anexo 2). Luego, fueron inoculadas con 1 mL de suspensión de cada concentración, de cada aislamiento nativo, con ayuda de una micropipeta (Boeco) y el tratamiento control con 1 mL de agua destilada estéril + Tween 80 al 0,1% (Anexo 3). Se mantuvieron a temperatura ambiente de 23 ± 1 °C y humedad relativa de $80,20 \pm 5,3\%$. Cada tratamiento estuvo compuesto de 50 ninfas (10 ninfas/réplica) y dispuestos en un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos (cuatro aislamientos nativos y el tratamiento control).

En cada tratamiento se registró diariamente la mortalidad hasta el sexto día después de la inoculación. Con los datos de mortalidad diarios se determinó la mortalidad acumulada total y la mortalidad corregida, hasta el sexto día después de la inoculación, mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba Geigy, 1981):

$$\% \text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{Mortalidad en el tratamiento} - \% \text{Mortalidad en el control}}{100 - \% \text{Mortalidad en el control}} \times 100$$

Para determinar la mortalidad confirmada (Porcentaje de individuos muertos que presentan crecimiento del hongo sobre sus cuerpos), cada insecto muerto fue desinfectado superficialmente en alcohol al 70%, durante 3 minutos y lavado 3 veces con agua destilada estéril y fueron colocados en placas de Petri conteniendo un tapón de algodón humedecido y papel de filtro en el fondo; se sellaron con papel parafilm y se colocaron en cámara climatizada a temperatura de 27 ± 1 °C. Por medio de este procedimiento se obtuvo la confirmación de la mortalidad causada por el hongo *M. anisopliae*, observando el crecimiento micelial y conidiogénesis sobre el cadáver (Freitas *et al.*, 2012) (Anexo 4).

3.4.3. Elaborar una propuesta para la incorporación de *M. anisopliae* en el control biológico de ninfas de *M. andigena* en condiciones de campo.

En base a los resultados del experimento Se realizó una propuesta para la incorporación de los aislamientos más promisorios de *M. anisopliae* en el control biológico de ninfas de *M. andigena* en condiciones de campo. Apoyada en las diferentes tácticas culturales existentes en el control de este insecto plaga reportadas en la literatura, que se adapten a las condiciones locales de la provincia de Pastaza.

3.5. Tratamiento de Datos.

El análisis de los datos obtenidos de los tratamientos en cuanto a tamaño de la colonia, tasa de crecimiento y producción de conidios se realizó a través de un análisis de varianza bifactorial. Para conocer las diferencias entre las medias en cada una de las variables evaluadas se realizó la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Para ello se empleó el paquete estadístico SPSS Versión 20.

Para comparar los tratamientos en cuanto a mortalidad acumulada y corregida se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), previa transformación de los datos de mortalidad mediante la expresión $\arccos \sqrt{x/100}$. Para el análisis se empleó el programa INFOSTAT Versión 2015. La comparación de los tratamientos en cuanto a mortalidad confirmada se realizó mediante el sistema de comparación múltiple de proporciones CompaProWin 2.0.1., con el método Wald por corrección.

3.6. Materiales.

Físicos

Tijeras de podar (PRETUL), papel periódico, fundas autoclavables, tarrinas plásticas transparentes de 400 mL, pinceles, pinzas metálicas, Erlenmeyer de 100 mL, 500 mL y 1000 mL (CITOGLAS), placas de Petri de dimensión 100 x 15 mm, asa de inoculación, sacabocados de 5 mm de diámetro, lámpara de alcohol, cuchillo (TRAMONTINA), vasos de precipitación de 50 mL, 250 mL y 600 mL (OBEROI UK), probeta de 250 mL, bandejas plásticas, gasa, tubos eppendorf de 2 mL, parafilm (BEMIS®), papel filtro, micro pipeta (SOCOREX SWISS 10-100 µl), bolsas herméticas con cierra fácil (16,5 cm x 14,9 cm), tubo de ensayo de 10 mL con tapa de rosca, goteros plásticos, espátula metálica, marcadores permanentes, cámara de Neubauer, gradilla plástica para eppendorf y tubos de 10ml, registro de datos.

Biológicos

Ninfas de *M. andigena*, hojas de caña de azúcar, aislamientos de *M. anisopliae*

Equipos

Autoclave (Wisd LABORATORY INSTRUMENTS), cámara de flujo laminar (LABCONCO), incubadora (MEMMERT IN 110), cámara fotográfica (SONY), refrigerador (INDURAMA), pH metro (HANNA), plato agitador magnético (IKA C-MAG HS 7), balanza analítica (22 ADAM), ultra congelador (WUF-D300; Wisd), microscopio trinocular (MEIJI), computador portátil (Hp), cámara de Neubauer.

Insumos

Arroz precocido, agua destilada estéril, glicerol al 15% (v/v), alcohol al 70% (v/v) y 90% (v/v), Saboraud Dextrose Agar (SDA) (Difco), Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco), Malt Extract Agar (AEM) (Difco) y Potato Dextrose Agar (PDA) modificado [(39 g/L de PDA, 4,5 g/L de extracto de levadura (Difco), 4,5 g/L de peptona (Difco) y ácido láctico al 25%.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización morfológica de los aislamientos nativos del hongo *M. anisopliae* en diferentes medios de cultivo.

En los cuatro medios de cultivo evaluados se evidenció crecimiento vegetativo, con colonias inicialmente de color blanco, de bordes regulares, textura algodonosa, de forma redonda. Los conidios fueron apareciendo en forma de anillos radiales alrededor del centro, inicialmente de color verde claro y posteriormente se tornaron de un color verde oscuro. Este comportamiento fue más visible en el medio PDA modificado, que en los restantes medios de cultivo, los que presentaron conidios dispersos alrededor del centro de la colonia.

En cuanto al crecimiento vegetativo (micelial) no se evidenciaron diferencias significativas entre los aislamientos, los que presentaron diámetros de las colonias entre 63,45 y 64,85 mm. No obstante, se presentaron diferencias en el tamaño de las colonias en los diferentes medios de cultivo. Los cuatro aislamientos presentaron un mayor crecimiento vegetativo sobre los medios AEM y SDA con valores que variaron entre 68,2 y 71,1 mm, sin diferencias significativas entre ellos y con diferencias significativas con los restantes medios. El menor crecimiento vegetativo se produjo sobre el medio PDA modificado con valores entre 52,1 y 55,9 mm (Fig. 1).

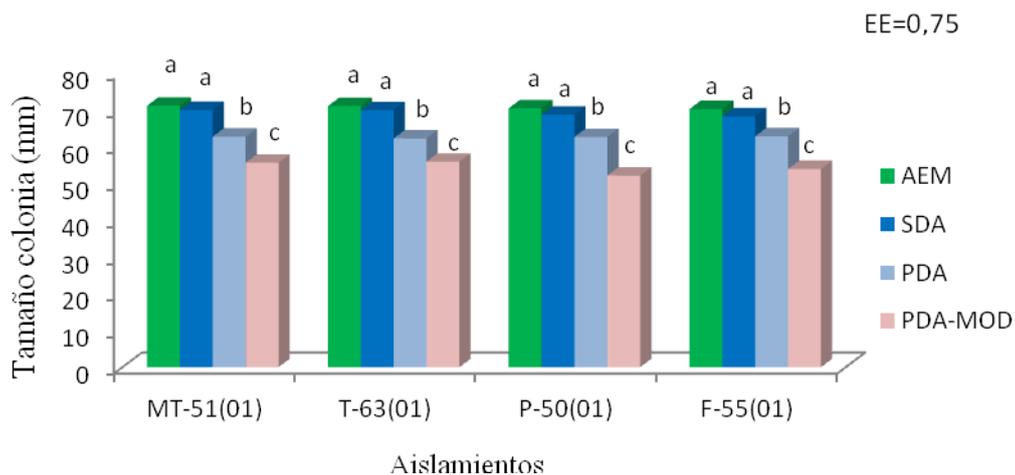


Figura 1. Tamaño de las colonias de los aislamientos de *M. anisopliae* a los 20 días de desarrollo en diferentes medios de cultivo. Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el presente estudio, el tamaño de las colonias de los aislamientos nativos evidenciaron valores superiores a los informados por Skalický *et al.* (2013) quienes al evaluar diferentes aislamientos de *M. anisopliae*, a los 21 días obtuvieron tamaños de colonias entre 32 y 50 mm sobre PDA, a temperatura de 20 °C.

En relación a la tasa de crecimiento, en el presente estudio se evidenciaron los mayores valores sobre los medios AEM y SDA que oscilaron entre 3,16 y 3,3 mm.día⁻¹, con diferencias significativas con el resto de los medios de cultivo. En el medio PDA modificado, se presentó la menor tasa de crecimiento con valores que fluctuaron entre 2,38 y 2,54 mm.día⁻¹ (Fig. 2).

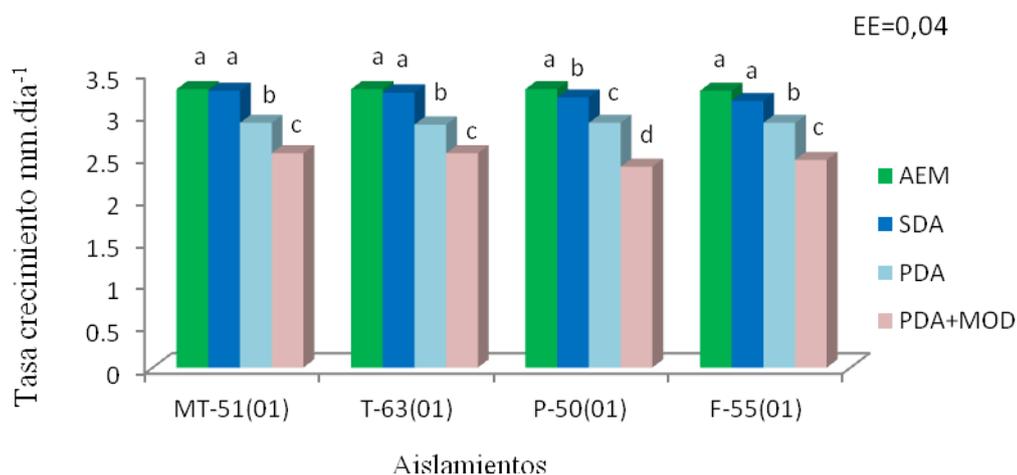


Figura 2. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *M. anisopliae* en diferentes medios de cultivo. Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el presente estudio los valores de la tasa de crecimiento son ligeramente superiores a los obtenidos por Dimbi *et al.* (2004), quienes al evaluar el crecimiento de seis aislamientos de *M. anisopliae* encontraron una tasa de crecimiento de 2,30 y 3,22 mm.día⁻¹ sobre el medio de cultivo SDA, a temperatura de 25 °C durante un período de doce días de incubación.

En otro estudio, Pik *et al.* (2009), al evaluar tres aislamientos de *M. anisopliae* sobre PDA y SDA, con adición del 1% de extracto de levadura obtuvieron una tasa de crecimiento

entre 5,35 y 6,54 mm.día⁻¹, superior a la tasa de crecimiento obtenida en el presente estudio, en condiciones similares de temperatura.

La tasa de crecimiento de 2,38 y 2,54 mm.día⁻¹ obtenido en el medio PDA modificado, es superior a lo observado por García *et al.* (2012), quienes al evaluar diferentes aislamientos de *M. anisopliae* encontraron que tres de ellos produjeron una mayor tasa de crecimiento, con valores entre 1,5 y 1,8 mm.día⁻¹, sobre este mismo medio de cultivo a una temperatura de 26 °C.

En la Tabla 1, se presenta la producción de conidios de los aislamientos nativos en los diferentes medios de cultivo estudiados, la que fue inversamente proporcional al crecimiento vegetativo, en este sentido la mayor producción se produjo sobre el medio PDA modificado, donde se destacaron los aislamientos MT-51(01) y T-63(01) con concentraciones entre 8,2 y 7,90 x 10⁶ conidios.cm⁻², con diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Tabla 1. Producción de conidios de los aislamientos nativos de *M. anisopliae* crecidos en los diferentes medios de cultivo.

Aislamiento/medio	X10 ⁶ (conidios.cm ⁻²)
MT-51(01)/PDA-MOD	8,21 a
T-63(01)/PDA-MOD	7,90 a
P-50(01)/PDA-MOD	5,32 b
F-55(01)/PDA-MOD	4,51 b
MT-51(01)/PDA	4,49 b
T-63(01)/PDA	3,19 c
P-50(01)/PDA	2,09 cd
F-55(01)/PDA	1,99 d
T-63(01)/ SDA	1,95 d
F-55(01)/ SDA	1,68 d
MT-51(01)/ SDA	1,67 d
T-63(01)/AEM	1,53 d
P-50(01)/ SDA	1,32 de
P-50(01)/AEM	1,21 de
MT-51(01)/AEM	1,08 de
F-55(01)/AEM	0,31 e
EE	0,19

Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey (p ≤ 0,05)

En este estudio, los cuatro aislamientos nativos de *M. anisopliae* presentaron una escasa producción de conidios en los medios de cultivo AEM y SDA, en relación con el medio PDA modificado, donde se obtuvo la mayor producción de conidios, lo que pudo estar condicionado por la adición de extracto de levadura y peptona.

Los resultados del presente estudio son similares a estudios previos realizados al respecto. Shah *et al.* (2005) informaron que la cepa V25 de *M. anisopliae* crecida en PDA produjo $1,1 \times 10^7$ conidios.cm⁻² y cuando adicionaron 1% de extracto de levadura obtuvieron $2,5 \times 10^7$ conidios.cm⁻² lo cual representa un aumento de 2,2 veces. Mustafa y Kaur (2009) con *M. anisopliae* y *B. bassiana* verificaron un mayor crecimiento micelial en los medios AEM y SDA pero poca esporulación en estos medios de cultivo.

Según Lima (2007) la adición de extracto de levadura y peptona incrementa la cantidad de nitrógeno en el medio que puede provocar un incremento en la esporulación, debido a que estos componentes son las principales fuentes de nitrógeno, ricos en proteínas y aminoácidos. Así mismo, Méndez *et al.* (2009) indicaron que medios de cultivo ricos, tanto en nitrógeno como en carbono, favorecen la producción de biomasa.

Por otro lado, Prakash *et al.* (2008) observaron una máxima producción de conidios en tres sustratos, con la adición de extracto de levadura a una concentración de 1,45% para arroz, 2,21% para cebada y 1,54% para sorgo. Así mismo, evidenciaron que una alta concentración de extracto de levadura produjo un alto crecimiento micelial, pero con una esporulación baja.

Según García *et al.*, (2012) este elemento es muy importante cuando se trata de usar comercialmente una cepa de un hongo, ya que una alta producción de conidios hace más viable su comercialización y reduce los costos de su implementación en el campo.

4.2. Eficacia de aislamientos nativos de *M. anisopliae* en el control de ninfas de *M. andigena* en condiciones de laboratorio.

En el presente estudio, se observó que los aislamientos MT-51(01) y P-50(01) presentaron altos porcentajes de mortalidad que fueron significativamente diferentes a los demás tratamientos, con mortalidades acumuladas totales de 98%. Para la mortalidad corregida los aislamientos MT-51(01), P-50(01) y T-63(01) no presentaron diferencias significativas

entre sí, con valores de 96,7%, 96% y 68,9%, respectivamente. El tratamiento con el aislamiento F-55(01) presentó la menor mortalidad corregida, con diferencias significativas con los aislamientos nativos MT-51(01) y P-50(01), pero no fue diferente del aislamiento T-63(01) (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Mortalidad acumulada total a los 6 días de aplicado los tratamientos sobre ninfas.

Tratamientos	Mortalidad Acumulada Total (%)	
	X original	X transf.
MT-51(01)	98,00	1,51 a
P-50(01)	98,00	1,51 a
T-63(01)	74,00	1,05 b
F-55(01)	72,00	1,04 bc
Testigo	38,00	0,65 d
CV		0,17
EE.		0,07

Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Mortalidad corregida a los 6 días de aplicados los tratamientos sobre ninfas de *M. andigena*.

Tratamientos	Mortalidad Corregida		
	X original	X transf.	
MT-51(01)	96,67	1,49	a
P-50(01)	96,00	1,48	a
T-63(01)	68,97	0,99	ab
F-55(01)	60,32	0,84	b
CV		0,29	
EE.		0,12	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los resultados de mortalidad obtenidos en el presente estudio, se encuentran dentro del rango informado por Loureiro *et al.* (2005), quienes al evaluar 79 aislamientos de *M. anisopliae* observaron mortalidades totales de 66 a 100% y mortalidad corregida de 0,00 a 100% en ninfas de *M. fimbriolata* a los seis días después de la inoculación. Así como, se encuentran dentro del rango de valores observados por Freitas *et al.* (2012), quienes verificaron mortalidades de 90 a 100% (mortalidad total) y 55 a 85,7% (mortalidad corregida) a los seis días de la inoculación sobre ninfas de *M. fimbriolata* con los aislamientos CG 423 y UFGD 18 de *M. anisopliae*, respectivamente.

La aparición de insectos muertos ocurrió principalmente a partir del cuarto día de la inoculación, que según señalan varios autores (Loureiro *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2012) corresponde al segundo o tercer día después de la fase de penetración del hongo.

En otro estudio, Macedo *et al.* (2006) observaron mortalidades corregidas en ninfas de *M. fimbriolata* que varió entre 10,5 y 60% a los cinco días de la inoculación, con una concentración de 5×10^7 conidios.mL⁻¹ de *M. anisopliae*.

En la Tabla 3 se evidencia que los aislamientos MT-51(01) y P-50(01) provocaron los mayores porcentajes de mortalidad confirmada con diferencias significativas con el aislamiento F-55(01). En el tratamiento control, no ocurrió esporulación sobre los cadáveres de las ninfas, lo que indica que no hubo contaminación de los restantes tratamientos.

Tabla 3. Mortalidad confirmada sobre ninfas de *M. andigena*.

Tratamientos	Mortalidad confirmada (%)
MT-51(01)	70,83 a
P-50(01)	65,30 a
T-63(01)	51,35 ab
F-55(01)	27,77 b
Control	0,00 c

Medias con letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$

Los resultados de mortalidad confirmada obtenida en el presente estudio con los aislamientos MT-51(01), P-50(01) y T-63(01) fueron superiores, a los encontrados por Tiago *et al.* (2011) quienes al evaluar la eficacia de nueve aislamientos de *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata* observaron mortalidades confirmadas entre 16 y 50%. Por otro lado, Loureiro *et al.* (2005) encontraron una baja mortalidad confirmada al comparar 27 aislamientos obtenidos de los salivazos de diferentes regiones de Brasil y sólo en dos aislamientos observaron mortalidades entre 80 y 88%, en el sexto día.

Los valores de mortalidad confirmada también presentan grandes variaciones, al ser evaluados sobre otros grupos de insectos. En este sentido, Neves (1998) encontró que el aislamiento 1037 de *M. anisopliae* provocó una mortalidad confirmada de 57, 8%, sobre Termitas *Cornitermes cumulans* (Kollar), a los 9 días después de la inoculación. Rohde *et*

al. (2006) al aplicar *M. anisopliae* sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer), observaron una mortalidad confirmada de 8,3 y 90% en larvas, y de 0 y 90% en adultos.

En el presente estudio, en determinados casos, se verificó que no existió crecimiento del hongo sobre los insectos muertos, lo que fue más evidente en aquellos insectos que murieron antes de los cinco días. Según Loureiro *et al.* (2005) en los insectos muertos, donde el hongo no se desarrolla puede haber ocurrido septicemia, caracterizada por el aspecto y el mal olor que presenta. Además, estos autores señalaron dos hipótesis que pueden explicar esta situación. La primera es que el hongo haya facilitado la entrada de otros microorganismos (bacterias) a través de los orificios presentes en la cutícula, en el momento de la penetración y la segunda es que el hongo haya provocado un rompimiento del tejido epitelial por la germinación y penetración, o por la liberación de toxinas que destruyen la pared intestinal, facilitando la contaminación de la hemolinfa y produciendo una descomposición del insecto.

Por otro lado Ibarra *et al.* (2005) señalan que los insectos que mueren por la infección de hongos entomopatógenos esporulan abundantemente bajo condiciones de alta humedad; sin embargo, la esporulación no siempre ocurren, por lo que sólo las cepas que esporulan abundantemente sobre el cadáver de su hospedante tienen potencial de dispersión y de reciclaje en el medio ambiente. Los elementos anteriormente expuestos, permiten sustentar que los aislamientos MT-51(01) y P-50(01) garantizan una mayor diseminación del hongo con la consecuente infección de otros individuos de la población del insecto en condiciones de campo.

4.3. Propuesta para la incorporación de *M. anisopliae* en el control biológico de ninfas de *M. andigena* en condiciones de campo.

De manera general, Barbosa *et al.* (2011) señalaron que, el hongo *M. anisopliae* debe ser utilizado en el control especialmente de ninfas, tomando en cuenta los factores climáticos favorables, para un eficiente control. En este mismo sentido, Guagliumi (1971), hizo hincapié sobre el hecho de que deben ser las ninfas el objeto principal de control, para evitar que estas lleguen al estado adulto, ya que son los adultos los que principalmente causan la típica intoxicación sistémica, o toxigenia, en las hojas, reduciendo drásticamente el contenido de sacarosa. Además, Carvalho *et al.* (2011), señalaron que *M. anisopliae*, actúa principalmente sobre las ninfas, que en el estado de adulto existen restricciones

debido a la dificultad en la penetración en el tegumento del insecto. También, se ha informado, que la espuma producida por las ninfas proporciona condiciones favorables de humedad para el crecimiento del hongo (Freitas *et al.*, 2014).

De acuerdo a Loureiro *et al.* (2005) el aislamiento de *M. anisopliae* que provoque el 70% de mortalidad confirmada es seleccionado para ensayos a nivel de campo. La capacidad de esporulación de un aislamiento sobre los insectos infectados es un aspecto importante para que se genere un desencadenamiento de epizootias en campo, en condiciones ambientales favorables, de esta manera se mantenga o se aumente el potencial de inóculo en una determinada área. En el presente estudio el aislamiento que cumple este requisito es el aislamiento MT-51(01) con el 70, 83% de mortalidad confirmada.

Las aplicaciones del aislamiento MT-51(01) en campo se deben realizar al inicio del período de ocurrencia del salivazo, cuando los niveles poblacionales del insecto plaga se encuentren bajos. Particularmente, en el caso de *M. andigena* en la provincia de Pastaza, las aplicaciones de *M. anisopliae* se deben realizar cuando la población se encuentre alrededor de 3 ninfas por tallo (Mendoza *et al.*, 2004), y de acuerdo a un estudio realizado por Valle (2015) sobre las fluctuaciones poblacionales de ninfas de *M. andigena* en cuatro parroquias representativas de Pastaza, durante los años 2013 y 2014, estos niveles se presentan con regularidad entre los meses de diciembre y enero.

Además recomienda que las aplicaciones se deben realizar pasado las cuatro de la tarde, para evitar la incidencia de rayos ultravioletas y garantizar una mayor humedad relativa, las que deben estar dirigidas a los cogollos y vainas adheridas al tallo, que se encuentran semidesprendidas, así como, a los cogollos de los brotes jóvenes, para garantizar que los conidios del hongo entren en contacto con las ninfas y adultos localizados dentro de estos, lo que garantiza que el hongo promueva la reducción poblacional del insecto, al ser aplicado en el momento y de la manera correcta.

Por esta razón, las aplicaciones de *M. anisopliae* deben ir precedidas del control de malezas y por un deshoje para que se logre una mayor efectividad, ya que en cañaverales sin deshoje, se dificulta que la suspensión de conidios entre en contacto con las ninfas y adultos que se encuentran en el interior de las vainas foliares viejas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Los cuatros aislamientos nativos presentaron características morfológicas similares y de ellos los aislamientos MT-51(01) y T-63(01) presentaron la mayor producción de conidios en el medio de cultivo PDA modificado, con valores de 8,2 y 7,90 x10⁶ conidios.cm⁻².
- Los aislamientos nativos MT-51(01) y P-50(01) de *M. anisopliae* provocaron altos porcentajes de mortalidad confirmada con valores que estuvieron entre 71 y 65%, respectivamente.
- El uso del aislamiento nativo MT-51(01) de *M. anisopliae* junto a labores culturales de deshoje y control de malezas constituyen una alternativa agroecológica para disminuir los niveles poblacionales de este insecto plaga en el cultivo de caña de azúcar.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar ensayos a nivel de campo para la validación de la eficacia del aislamiento nativo MT-51(01) de *M. anisopliae*
- Mantener los cultivos de caña libre de malezas y deshojados durante todo el año con el fin de reducir los nichos de refugio del insecto plaga.
- Realizar la prospección y obtención de nuevos aislamientos de *M. anisopliae*.

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

6.1. Referencias Bibliográficas.

- Barbosa, R., Kassab, S., Fonseca, P. R., Rossoni, C., & Silva, A. (2011). Associação de *Metarhizium anisopliae* (Hyp.: Clavicipitaceae) e Thiamethoxam para o controle da cigarrinha-dasraízes em cana-de-açúcar. *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 15(5), 41-51.
- Carvalho, L. W., Micheletti, S. M., Carvalho, L. H., Dias, N. S., & Pérez, K. G. (2011). Incidencia de *Mahanarva fimbriolata* después de aplicaciones de *Metarhizium anisopliae* e Imidacloprid en caña de azúcar. *Revista Caatinga*, 24(1), 20-26.
- Castillo, 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*. (Tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- CENICAÑA. (2011). Salivazo de la caña de azúcar, recuperado de http://www.cenicana.org/pdf/plegable/el_salivazo_aeneolamia_varia.pdf
- Chen, Z., Xu, L., Yang, F., Ji, G., Yang, J., & Wang, J. (2014). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* isolate MAX-2 from Shangri-la, China under desiccation stress. *BMC Microbiology*, 14(4), 1-8.
- Ciba Geigy. (1981). *Manual de ensayos de campo en producción vegetal*, 2.a ed. Basilea, Suiza, 211 p.
- CINCAE. (2004). El salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena*. Vol 4. Recuperado de <http://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B0-4-Salivazo.pdf>
- CINCAE. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*, Vol 5. Recuperado de <http://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Producci%C3%B3n-Metarhizium-anisopliae-Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B05.pdf>
- CINCAE. (2015). Principales plagas de la caña de azúcar. Recuperado de <http://cincae.org/areas-de-investigacion/manejo-de-plagas/>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., & Mueke, J. M. (2004). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, 49, 83-94.
- FAO, (2003). Distribución global de la caña de azúcar. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/008/y9492s/y9492s07.htm>
- Freitas, A. F., Loureiro, E. S., Almeida, M. E., & Pessoa, L. G. (2012). Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera:Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Arq. Inst. Biol*, 79(2), 247-254.
- Freitas, A. F., Loureiro, E., Barbosa, M. E., & Pessoa, L. G. (2014). Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) cultivados em arroz. *Arq. Inst. Biol.*, 81(1), 75-78.
- Freitas, A. F., Loureiro, E., Barbosa, M. E., & Pessoa, L. G. (2014). Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) cultivados em arroz. *Arq. Inst. Biol.*, 81(1), 75-78.
- García, A. M., Bustillo, A. E., Castro, U., & Arenas, Y. (2012). Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (Hemiptera: Cercopidae) de la caña de azúcar en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 252-259.

- García, A. M., Bustillo, A. E., Castro, U., & Arenas, Y. (2012). Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (Hemiptera: Cercopidae) de la caña de azúcar en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 252-259.
- Gobierno autónomo descentralizado provincial de Pastaza (GAPPz). (2010). La producción de la caña de azúcar en la provincia de Pastaza. Recuperado de https://www.google.com.ec/?gfe_rd=cr&ei=tzgRV6OvKsHI8AeApIGYDg#
- Gómez, P. P., & Mendoza, M. J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la caña de azúcar de Ecuador. Publicación técnica no. 5.
- Guagliumi, P. (1971). Lucha integrada contra las “Cigarrinhas” (Homoptera: Cercopidae) en el Noroeste del Brasil. *Revista Per. Entom.*, 14(2), 361-368.
- Hernández, C. A., & Herrera, L. (2014). Variabilidad cultural, morfológica y patogénica entre aislados de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes caracteres Cultural, morphological and pathogenic variability among isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Centro Agrícola*, 41(1), 39-45.
- Ibarra, G., Moya, G., & Berlanga, A. (2005). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomol. Mex.*, 44(1), 1-6.
- Instituto Nacional de Estadísticas y censos (INEC), (2011). La caña de azúcar en el Ecuador. Recuperado de https://www.google.com.ec/?gfe_rd=cr&ei=tzgRV6OvKsHI8AeApIGYDg#
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). (2014). Boletines de clima del Ecuador. Tomado de: <http://www.inamhi.gob.ec/index.php/clima/boletines/mensual/> [Consultado: 10 enero 2014]
- Lecuona, R. (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Talleres gráficos Mariano.
- Lima, E. L. (2007). *Produção de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. e Beauveria bassiana (bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura Sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos.* (Tesis Doctoral). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Brasil.
- Loureiro, E. S., Filho, A. B., Almeida, J. E., & Pessoa, L. G. (2005). Seleção de Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a Cigarrinha da Raiz da Cana-de-Açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Laboratório. *Neotropical Entomology*, 34(5), 791-798.
- Macedo, D., Alves, S. B., & Vieira, S. A. (2006). Screening of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Strains against *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). *Semina: Ciências Agrárias*, 27(1), 47-52.
- Méndez, A., Del Pozo, E., & García, I. (2009). Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista Protección Vegetal*, 24(3), 156-161.
- Mendoza, J. (2001). Progresos en el manejo de plagas en caña de azúcar en Ecuador, 1-7. Recuperado de http://www.aeta.org.ec/2do%20congreso%20cana/art_campo/MENDOZA%20cana.pdf
- Mendoza, J. (2003). Control biológico del salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena*. Vol 4. Recuperado de <http://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B0-4-Salivazo.pdf>

- Mendoza, J., Gualle, D., & Gómez, P. (2013, septiembre). *Plagas potenciales: una amenaza para el cultivo de la caña de azúcar en Ecuador*. En Memorias del III Congreso de la Caña de Azúcar, sus Derivados y Bioenergía, realizado por la Asociación Ecuatoriana de Tecnólogos Azucareros, Guayaquil, Ecuador.
- Mendoza, J., Gualle, D., Gómez, P., Ayora, A., Martínez, I., & Cabezas, C. (2005). Progresos en el manejo de plagas en caña de azúcar en Ecuador. (pp. 1-15). Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador.
- Mendoza, J., Gualle, D., Gómez, P., Ayora, A., Martínez, I., & Cabezas, C. (2005). Progresos en el manejo de plagas en caña de azúcar en Ecuador. (pp. 1-15). Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador.
- Mendoza, J., Mejía, K., & Gualle, D. (2004). El salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena*. Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador. Publicación técnica no. 4.
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Agua*, 6(2), 77-90.
- Mustafa, U., & Kaur, G. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research*, 3(10), 922-930.
- NETAFIN, (2010). La caña de azúcar. Recuperado de <http://canadeazucaranhuaac.blogspot.com/>
- Neves, P. M. (1998). *Seleção de isolados de Beauveria bassiana e Metarhizium anisopliae e controle de Cornitermes cumulans (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae)*. (Tesis Doctoral). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, Brasil.
- Obando, J. A., Bustillo, A. E., Castro, U., & Mesa, N. C. (2013). Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 26-33.
- Pavone, D., & Dorta, B. (2010). Efecto de agroquímicos sobre el desarrollo del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda*. *Bioagro*, 22(2), 105-114.
- Pik, K. H., Choon, J. B., Kadir, J., & Amartalingam, R. (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) Isolates and their effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 289-297.
- Prakash, G. V., Padmaja, V., & Kiran, R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99, 1530-1537.
- Rai, D., Updhyay, V., Mehra, P., Rana, M., & Pandey, A. K. (2014). Potential of entomopathogenic fungi as biopesticides. *Ind. J. Sci. Res. and Tech.*, 2(5), 7-13.
- Ramanujam, B., Rangeshwaran, R., Sivakmar, G., Mohan, M., & Yandigeri, M. S. (2014). Management of Insect Pests by Microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80 (2), 455-471.
- Rodríguez, J. C., & Peck, D. C. (2007). Biología y hábitos de *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae) en condiciones de casa de malla. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(1), 31-35.
- Rodríguez, J. C., Peck, D. C., & Canal, N. A. (2002). Biología comparada de tres especies de salivazo de los pastos del género *Zulia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 28(1), 17-25.

- Rohde, C., Alves, L. F., Neves, P. M., Alves, S. B., Silva, E. R., & Almeida, J. E. (2006). Selección de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 35(2), 231-240.
- Sandino, D. (2003). Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Recuperado de <http://www.sidalc.net/repdoc/A0952e/A0952e.pdf>
- Santos, S., Lopes, R., & Faria, M. (2011). Emulsifiable oils protect *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium pingshaense* conidia from imbibitional damage. *Biological Control*, 59, 261-267.
- Schapovaloff, M. (2012). Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, La plata.
- Schapovaloff, M. E., Alves, L. F., Fanti, A. L., Alzogaray, R. A., & López, C. C. (2014). Susceptibility of adults of the cerambycid beetle *Hedypathes betulinus* to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Insect Science*, 14(127).
- Shah, F., Wang, C., & TM, B. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259-266.
- Sivakalai, S., & Ramanathan, N. (2015). Simple and cost effective method for mass production of entomopathogenic fungi by using naturally available substrate. *International journal of frontiers in science and technology*, 2(4), 67-77.
- Teixeira, V. M. (2010). *Eficiencia de Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. No controle de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) em campim-marandu (*Brachiaria bryzantha*) em Corumbiaria, Rondonia. (Tesis de Maestría). Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
- Tiago, P. V., Souza, H. M., Moysés, J. B., Oliveira, N. T., & Lima, E. A. (2011). Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and the Control of the Sugarcane Root Spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. *Brazilian Archives of biology and technology*, 45(3), 435-440.
- Valle, S. (2015). *Particularidades bioecológicas de Mahanarva andigena* (Jacobi) como base para el manejo con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en la caña de azúcar *Saccharum spp. híbrido* en Pastaza, Ecuador. (Tesis doctoral). Universidad de Granma, Cuba.
- Xiangqun, N., Liu X., Wang, Q., Dong, C., Wang, G., Cao G., & Zhang, Z. (2015). Phoxim and manure enhanced the population rebound and preservation of *Metarhizium anisopliae* applied in soil. *Biocontrol Science and Technology*, 25:1, 84-96.

CAPÍTULO VII: ANEXOS

7.1 Anexos

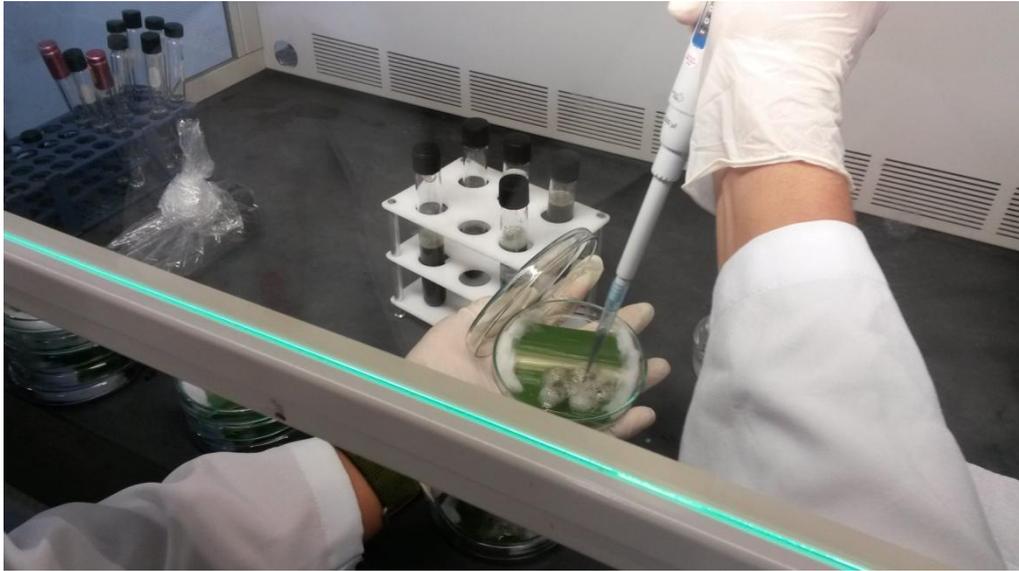
7.1.1. Medios de cultivos utilizados en los experimentos



7.1.2. Montaje de experimento para evaluar la eficacia sobre ninfas



7.1.3. Aplicación tratamientos sobre ninfas



7.1.4. Mortalidad confirmada sobre ninfas en tratamiento con *M. anisopliae* y control

Tratamiento Control



Tratamiento con *M. anisopliae*



