

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA



TÍTULO:

“CONTROL BIOLÓGICO DEL SALIVAZO (MAHANARVA ANDIGENA) EN CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM L) CON METARHIZIUM SP. SECTOR LOS ÁNGELES PARROQUIAS PUYO”

TESIS DE GRADO
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: Wilson Daniel Cajilima
Arcos

Tutores:
Dr. Miguel Ángel Iparraguirre Cruz
Ing. Wilfrido De La Cruz

Puyo, Pastaza, 2009

AGRADECIMIENTO

Saber vivir es vivir con sabiduría, prudencia y dignidad, la gratitud es uno de los sentimientos mas nobles del hombre, deseo expresar mi agradecimiento a DIOS sobre todas las cosas, a mis padres, a la Universidad Estatal Amazónica, Carrera de Ingeniería Agropecuaria por abrirme las puertas de tan prestigiosa institución y con ello lograr mi titulo profesional, al Dr. Miguel ángel Iparraguirre de la Universidad Ciego de Ávila Cuba, al Ing. Wilfrido De La Cruz de AGROCALIDAD.

Con cariño wilo.

DEDICATORIA

A DIOS por la fortaleza y sabiduría que ha depositado en mí.

A mis padres Manuel Cajilima y Dora Arcos por estar conmigo en el transcurso de mi vida, por brindarme su apoyo y cariño incondicional en las metas que me he planteado.

A mi hermana por ser una gran amiga y consejera en los momentos de debilidad.

A Angélica que estuvo a mi lado en los momentos decisivos de mi vida, por su apoyo y cariño.

A mis tios, tias y primos que me alentaron a seguir.

Y a todos los que creyeron y depositaron su confianza en mí.

ÍNDICE

	Paginas
Lista de Tablas. Lista de Imágenes. Lista de Anexos. Resumen	
1 INTRODUCCIÓN	1
2 FUNDAMENTACIÓN	2
2.1 Caña de azúcar <i>Saccharum Officinarum</i> .	4
2.1.1 Generalidades	4
2.1.2 Clasificación Botánica	4
2.1.3 Características del Cultivo	4
2.1.4 Aprovechamiento	4
2.1.5 Exigencias del Cultivo	4
2.1.6 Variedades	5
2.1.7 Distancia de Siembra	5
2.2 Plagas de Importancia Económica en la caña de azúcar	5
2.2.1 Salivazo	5
2.2.1 Clasificación Taxonómica	5
2.2.3 Distribución Geográfica y Hospedante del Salivazo	5
2.2.4 Ciclo de vida del Salivazo	6
2.2.5 Descripción de estados de vida del salivazo	6
2.2.5.1 Huevo	6
2.2.5.2 Ninfa	6
2.2.5.3 Adulto	6
2.2.6 Patrones de Comportamiento y Distribución Espacial de Salivazo	7
2.3 Control y Manejo de Salivazo Mediante Hongos Entomopatógenos	7
2.3.1 Ciclo de Vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	8
2.3.2 Acción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	8
2.3.3 Factores que Influyen en el Establecimiento y Acción del Hongo Entomopatógeno	10
2.3.3.1 Humedad Relativa	11
2.3.3.2 Temperatura	11
2.3.3.3 Radiación Solar	11
2.3.3.4 Suelo	12
3 MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Localización del área Experimental	13
3.2 Etapas de Investigación	13

3.2.1	Laboratorio	13
3.2.1.1	Recolección de Insectos parasitados	13
3.2.1.2	Preservación de la muestra en Cámara Húmeda	14
3.2.1.3	Aislamiento de <i>Metarhizium sp.</i>	15
3.2.1.4	Preparación de Medios de Cultivo PDA y SDA	16
3.2.1.5	Siembra de cepas de <i>Metarhizium sp</i>	18
3.2.1.6	Incubación del Cultivo	19
3.2.1.7	Anillos de Crecimiento	19
3.2.1.8	Identificación Morfocultural del hongo	20
3.2.1.9	Producción Masiva	21
3.2.2	Campo	22
3.2.2.1	Hoja de Campo para Muestreo de Insectos	23
3.2.2.3	Ensayos de Campo	24
3.2.2.3.1	Para el Laboratorio	24
3.2.2.3.1	Para el Campo	24
3.2.2.4	Determinación de la Efectividad Biológica	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1	Registro de <i>Metarhizium spp</i> como parásito natural del salivazo en cultivo de caña de Azúcar Sectores Las Américas y la Tarqui.	26
4.1.1	Descripción de cepas en PDA	26
4.1.1.1	<i>Metarhizium sp</i> sector las Américas vía Tena km4 Vz cepa 1 Sr. Valverde en PDA	26
4.1.1.2	<i>Metarhizium sp</i> sector las Américas vía Tena km4 Yz cepa 2 (Américas) en PDA	27
4.1.1.3	<i>Metarhizium sp</i> sector la Parroquia Tarqui cepa 3 en PDA	29
4.2	Clasificación taxonómica del hongo recolectado	30
4.3	Selección del medio de cultivo para el cepario de <i>Metarhizium sp</i>	30
4.4	Medios de Cultivo Sólido para empleo en la reproducción masiva de <i>Metarhizium sp</i>	35
4.4.1	Pureza	36
4.4.2	Crecimiento	36
4.4.3	Concentración de esporas por mi.	37
4.5	Efectividad Biológica de <i>Metarhizium sp.</i> en el Control de Saliva <i>Mahanarva andigena</i> en el cultivo de caña	37
5.	CONCLUSIONES	39
6.	RECOMENDACIONES	39
7.	BIBLIOGRAFÍA	40
8.	ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS.

	Páginas
I Recolección de Insectos parasitados	13
2. Aislamiento de Insectos parasitados en laboratorio	15
3. Preparación de Medios de cultivo PDA y SDA	17
4. Incubación de cultivo	19
5. Toma de diámetros de la colonia y caracterización morfocultural	21
6. Reproducción masiva de <i>Metarhizium sp</i> en sustrato sólido mote	22
7. Características morfoculturales cepa C1	27
8. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium sp</i> sector las América Cepa C1 en PDA	27
9. Características morfoculturales cepa C2	28
10 Crecimiento del hongo <i>Metarhizium sp</i> sector las América Cepa C2 en PDA	28
II Características morfoculturales cepa C3	29
12. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium sp</i> sector la Tarqui Cepa C3 en PDA	30
13. Características morfoculturales de <i>Metarhizium sp</i> en PDA	31
14. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium sp</i> en medio de cultivo PDA	32
15. Características morfoculturales de <i>Metarhizium sp</i> en SDA	33
16. Crecimiento del hongo <i>Metarhizium sp</i> en medio de cultivo SDA	33
17. Efectividad Biológica de tres titulaciones de <i>Metarhizium sp</i>	38
18. Efectividad Biológica de <i>Metarhizium sp</i> en ninfas y adultos de <i>Mahanarva andigena</i>	38

LISTA DE TABLAS.

	Páginas
1. Hoja de monitoreo para el control de <i>Mahanarva andigena</i>	23
2. Concentración de conidias de <i>Metarhizium sp</i> por mi.	34
3. Crecimiento de <i>Metarhizium sp</i> en sustrato sólido mote	36
4. Fases de crecimiento de <i>Metarhizium sp</i> en días	36

LISTA DE ANEXOS.

	Páginas
1. Anexo 1 ANOVA y Prueba de Tukey para el crecimiento y medios de cultivo a las 624 horas de <i>Metarhizium sp</i> en medios de cultivo PDA y SDA	47
2. Prueba de Duncan para la Efectividad Biológica a los siete días de la segunda aplicación	40

RESUMEN

La producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) en la Provincia de Pastaza se constituye entre los cultivos de importancia económica, sin embargo ha soportado severos ataques de salivazo (*Mahanatva andigena*) plaga que ha ocasionado disminución en calidad y cantidad de la cosecha, produciendo pérdidas económicas al sector agrícola e industrial, debido a esto se busca una alternativa en el control biológico; se aislaron cepas nativas del entomopatógeno *Metarhizium sp*, de los sectores Tarqui y Las Américas. para ser utilizado como insecticida biológico, evitando así el uso de insecticidas químicos sintéticos que causan daños al medio ambiente y la salud del hombre. En condiciones de laboratorio se realizó la caracterización morfo-cultural del entomopatógeno, determinándose que existen diferencias entre cepas, atribuyéndose la existencia de dos cepas de *Metarhizium sp*. diferentes, el crecimiento del entomopatógeno se realizó en dos medios de cultivo sintéticos PDA y SDA donde la cepa C2 a las 624 horas alcanzó un mejor crecimiento de 7.80 cm de diámetro y en SDA a las 624 horas alcanzó un crecimiento de 8.00 cm de diámetro, a nivel de campo se evaluaron tres titulaciones de 2.8×10^7 , 4.8×10^7 , 1.1×10^8 conidias/ml, determinando que la Efectividad Biológica con titulación de 1.1×10^8 conidias/ml alcanzó el 90.95%. **Palabras clave:** Control biológico, entomopatógeno. efectividad biológica.

SUMMARY

The sugar cane production (*saccharum officinarum*) in the Pastaza Province is counted among the economical important products. even though they have faced severe salivazo attacks (*Mahanarva indígena*) which is a plague that deminishes their quality and quantity producing economic losses to the industrial and agricultural sector, a new alternative is used in their biológica! control due to this...this is why vve isolated a kind of entomopotageno Fungus Entomopatógeno *Metarhizium sp*, from Tarqui and Las Américas, to be used as a biological insecticide to avoid chemical insecticides which cause damages to our environment and to human health. In lab conditions we made a color morfo-cultural characterization, micilio. a type of conidios, determining that there are layer differences between kinds coming to the conclusión that there are two kinds of *Metarhizium sp*. The growth of entomopatógeno was determined in PDA and SDA environments where the stump C2 at 624 hrs reached a 7.80 cm diameter growth and in SDA at 624hrs it reachhed a 8.00 cm diameter growth with a 10 conidios/ml. Titualtion evaluations were made at a country level of 2.8×10^7 , 4.8×10^7 , 1.1×10^8 conidias/ml were its biological effectivity was determined. It was determined that the

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar se cultiva en países tropicales y subtropicales de todo el mundo por el azúcar que contiene en los tallos (Encarta, 2007).

En el Cantón y Provincia de Pastaza la caña de azúcar (*Saccharum officinarum L*) es uno de los cultivos de importancia económica por generar fuentes de trabajo, debido a la necesidad de mano de obra durante su desarrollo e industrialización.

Los cultivos de caña de azúcar están afectados por diversos organismos que se agrupan bajo el contexto plaga que reducen el rendimiento del cultivo, incrementan costos de producción y afectan la calidad del producto (Pollack, 1994); destacándose entre ellos el salivazo (*Mahanarva andigena*) perteneciente al orden Homóptera y familia cercopidae (Helmuth, 2001).

El salivazo es uno de los principales problemas en el cultivo de la caña de azúcar en todas las zonas productoras de nuestro país, su desarrollo se ve favorecido por la alta humedad relativa que en nuestra provincia existe, provocando grandes pérdidas económicas a los cañicultores,

El daño es causado por los adultos que durante su alimentación perforan y chupan las partes verdes del cogollo, causando secamiento en las hojas, la típica intoxicación sistemática llamada "quema de las hojas" la que reduce el crecimiento de la planta y en casos extremos la seca por completo (Rodríguez *et al*, 2003).

Para reducir este efecto se procura la implementación de un sistema agrícola sostenible, basado en la alelopatía, control cultural, enemigos naturales y el uso de organismos entomopatógenos, que tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas.

Actualmente, se han identificado y estudiado diversas especies de hongos como agentes de control de plagas, muchos de ellos son utilizados exitosamente en programas MIP.

Por todo lo anteriormente explicado hemos definido y planteado el siguiente **PROBLEMA CIENTÍFICO**.

Daños que ocasiona al cultivo de caña de azúcar *Mahanarva andigena*.

Constituyendo el **OBJETO** de nuestro trabajo el salivazo (*Mahanaiva andigena*).

Proponiendo el siguiente **OBJETIVO: Objetivo General:**

- Controlar el salivazo (*Mahanarva andigena*) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) con *Metarhizium* sp. sector Los Ángeles Parroquia Puyo con acertados métodos de aplicación para disminuir los niveles de daño que ocasiona al cultivo

Objetivos Específicos:

- Reproducir la cepa de *Metarhizium* sp. obtenida en condiciones de campo
- Caracterizar aislamientos de cepas nativas de *Metarhizium* sp.
- Producir *Metarhizium* sp. en sustrato sólido
- Determinar la Efectividad Biológica de *Metarhizium* sp en tres titulaciones 2.8×10^7 , 4.8×10^7 , 1.1×10^8 , conidias / ml en condiciones de campo.

Definiendo la siguiente **HIPÓTESIS:**

El hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp puede reproducirse artificialmente en condiciones de laboratorio y constituirse un medio biológico para incrementar los niveles de parasitismo de *Mahanarva andigena* en el cultivo de caña, disminuyendo los daños que este ocasiona en tres titulaciones de 2.8×10^7 , 4.8×10^7 , 1.1×10^8

2. FUNDAMENTACION

2.1 Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L)

2.1.1 Generalidades:

Procede del Extremo Oriente, de donde llegó a España en el siglo IX. España la llevó a América en el siglo XV (Wikipedia, 2000; Encarta, 2007)

2.1.2 Clasificación Botánica:

Reino : Eucariota.

Orden : Poales

Familia : Poaceae (Gramineae)

Género : *Saccharum*

Especie : *officinarum* L. (Pérez, 2007)

2.1.3 Característica del Cultivo:

Es un cultivo plurianual. Se corta cada doce meses, la plantación dura aproximadamente cinco años. Tiene tallo macizo 2 a 5 m de altura. El sistema radicular lo compone un robusto rizoma subterráneo; puede propagarse por estos rizomas y por trozos de tallo (Pérez, 2007). La caña tiene una riqueza de sacarosa del 14% aproximadamente, aunque varía a lo largo de toda la recolección (Encarta, 2007).

2.1.4 Aprovechamiento:

La caña de azúcar suministra, en primer lugar, sacarosa para azúcar blanco o moreno. También tiene aproximadamente 40 kg de melaza (materia prima para la fabricación del ron). Se puede obtener 150 kg de bagazo y otros aprovechamientos como: el compost, vinazas, ceras, fibra absorbente, etc. (Wikipedia, 2007).

2.7.5 Exigencias del Cultivo:

La temperatura óptima de crecimiento oscila en los 30 °C, humedad relativa alta y buen aporte de agua. Se adapta casi ha todos los tipos de suelos, vegetando mejor y dando más azúcar en suelos ligeros (SICA, 2000).

2.1.6 Variedades:

Hay cientos de variedades en todo el mundo. En Ecuador y la Provincia de Pastaza se cultivan las siguientes variedades: Criolla, Blanca (Otahiti), Cristalina, Coimbatore 213, Media Luna 318, Pepe Cuca, POJ 2878, B. 42231, B 4362, PR 980, CP 5243, Ja 60.5, C. 8751, Caña de fruta: Limeña.

2.1.7 Distancia de Siembra:

En la Provincia de Pastaza la distancia recomendada es de 2 x 2 m por que es muy exigente en nutrientes, existen variedades paneleras, que se las siembra a 1x1; 0,5x1 m. (SICA, 2000; Pérez, 2007).

2.2 Plaga de Importancia Económica en la Caña de Azúcar.

2.2.1 Salivazo

El salivazo (*Mahanarva andigena*), Orden Homóptera, Familia Cercopidae, también conocido como mosca pinta, baba de culebra o chinche salivosa comprende 11 géneros y aproximadamente 360 especies de cercopidos registrados de los cuales entre 20-30 son plagas de gramíneas. Los géneros principales son *Aeneolamia*, *Deois*, *Mahanarva*, *Prosapia* y *Zulia* (Peck, 2001).

2.2.2 Clasificación Taxonómica:

Clase	: Insecta
Orden	: Homóptera
Sub orden	: Auchenorrhyncha
Súper familia	: Cicadoidea
Familia	: Cercopidae
Géneros	: <i>Mahanarva</i> (Peck, 2001).

2.2.3 Distribución Geográfica y Hospedante del Salivazo

Es una plaga del continente Americano que tiene una amplia distribución geográfica desde el Sureste de los Estados Unidos de América hasta el Noreste de Argentina y una distribución latitudinal desde los 0 hasta 3000 msnm (Peck, 2001; Rodríguez *et al.* 2003). El salivazo se desarrolla en muchas especies de plantas, como: caña de azúcar, maíz, arroz; numerosas poáceas silvestres y pastos.

2.2.4 Ciclo de Vida del Salivazo

Los cercópodos presentan metamorfosis gradual o sencilla denominada paurometábola que se caracteriza por los estados de huevo, ninfa y adulto, los jóvenes o ninfas tienen forma similar al insecto adulto (Pollack, 1994). El ciclo de vida del salivazo (*mahanarva andigena*) es de 55 - 75 días (Peck, 2001; Rodríguez *et al.* 2003; SESA 2003)

2.2.5 Descripción de Estados de Vida

2.2.5.1 Huevo

Los huevos de salivazo recién ovipositados presentan una coloración amarillo cremoso, no distinguiéndose ninguna estructura en especial, son alargados con una longitud promedio de 1 mm. y 0.3 mm de diámetro, con superficie lisa (Vargas, 1970; CIAT, 1982). A temperatura de 26 °C. y humedad relativa del 80 ó 90% los huevos incuban en periodos de 15 días, con un rango de 12 a 18 días. La mayoría de los huevos ovipositados al final del periodo de lluvias permanecen en el suelo en estado de diapausa hasta el inicio del siguiente periodo lluvioso, razón por la cual la primera generación de salivazo generalmente coincide con el inicio de las lluvias (CIAT, 1982).

2.2.5.2 Ninfa

Las ninfas recién eclosionadas están desprovistas de zonas quitinizadas, son sumamente activas e inmediatamente buscan refugio en partes húmedas y sombreadas de la base de las plantas e inician su alimentación, situándose generalmente en las raíces secundarias o tallos de la planta hospedera, la posición de alimentación es con la cabeza hacia abajo. Se caracterizan principalmente por la masa de espuma o "saliva" que producen para su defensa y protección (Bodegas, 1973; Pollack, 1994; SESA, 2003). La producción de espuma se lleva a cabo una vez que inician su alimentación, en el transcurso de 5 a 15

minutos (Bodegas, 1973). Aproximadamente en el 10% de las espumas cohabitan de 2 a 5 Bicincta (Peck, 1998), mientras que Pass y Reed (1965) reportan que el 51% de las masas de espuma contienen 2 o más en dependencia del genero. Durante el desarrollo de las ninfas se pueden identificar cinco instares o estadios (Fewkes, 1960; Fagan y Kuitert, 1969; Guagluimi, 1972; Bodegas, 1973, Coronado, 1978; CIAT, 1982; Peck, 2002; Peck, 2003; Rodríguez et al. 2003). Al final de cada instar la ninfa sufre una muda y aumento de tamaño, desarrollando progresivamente las estructuras alares y reproductivas. La duración de la fase ninfal depende de la especie de salivazo y de las condiciones ambientales (CIAT, 1982).

2.2.5.3 Adulto

El adulto presenta inicialmente un color blanco y permanece inmóvil durante varias horas dentro de la masa espumosa al contacto con el aire el cuerpo y las alas van adquiriendo lentamente su coloración normal por oxidación de sus pigmentos (CIAT, 1982) El macho mide de 7 a 8 mm de largo y la hembra es ligeramente más grande, son de 8 a 9 mm. de largo y de 5 a 6 mm de ancho. El cuerpo tiene una forma oval, la cabeza es de color oscuro o negro brillante, tiene ojos simples (ocelos) muy cercanos uno del otro, aparte de los ojos compuestos que se encuentran desarrollados. Las antenas están formadas por tres segmentos, el último es muy corto y 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 membranosa. Las patas son de color oscuro, el abdomen esta formado por nueve segmentos visibles, los dos primeros se encuentran reducidos (Rodríguez et. Al. 2003).

2.2.6 Patrones de Comportamiento y Distribución Espacial del Salivazo.

Las ninfas del salivazo permanecen estáticas y cubiertas de espuma que se localizan en las raices 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 por año si existen condiciones de humedad en el suelo, o

cuando existe un mal drenaje (Vargas, 1970; Guagliumi, 1972; Fontes et al. 1995; Martin et al. 1995; SESA, 2003).

2.3 Control y Manejo del Salivazo Mediante Hongos Entomopatógenos

El empleo de hongos entomopatógenos en el campo comenzó a fines del siglo XIX (Lecuona, 1996). Para el control de salivazo la dosis del hongo entomopatógeno *Metarhizium sp* es variado (Alves, 1986) se recomienda una dosis mínima de 1×10^{12} conidias/ha, con una frecuencia de 2 a 3 aplicaciones/año (Gómez, 2002; Carballo y Falguni, 2004; DIECA, 2004). Este hongo se encuentra en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc., logra buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, principalmente en los chupadores o succionadores los mismos que no pueden ingerir patógenos que infectan a través del tracto digestivo (Hajek, 1994). *Metarhizium anisopíiae* ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes, entre las plagas afectadas por este hongo se encuentra el salivazo de la caña de azúcar, chinches y plagas de diversos cultivos. 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). Debido a las características de la especie y/o de la cepa, ámbito de hospedantes, patogenicidad, virulencia y condiciones ambientales (Alves, 1986).

2.3.1 Ciclo de Vida de *Metarhizium anisopíiae*

Según Mayea (2004) Los hongos son organismos eucariontes que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y en cualquier clima, estos participan en todos los procesos biológicos, adquiriendo un rol vital en la evolución de la vida terrestre, en la dinámica de los ecosistemas y el mantenimiento de la biodiversidad (Hawksworth, 1991). El término entomopatógeno designa a aquellos microorganismos como: bacterias, hongos, nemátodos y virus que son capaces de matar insectos (Devotto *et al.*, 2000) o mantener a las plagas en niveles que no causan daño económico (Tanzini *et al.*, 2001). Son parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobre vivencia y parasitismo, sus mayores ventajas están en la manipulación, adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento (France *et al.*, 2003). Los hongos generalmente penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como

insecticidas de contacto, esta cualidad única permite ampliar el espectro de hospederos y atacar a insectos chupadores que son vectores de bacterias y virus, entre otros (Cornell University, 2007). Las esporas de los hongos son las que inician el proceso patogénico, luego de su adhesión a la superficie del insecto, una vez adheridas, las esporas germinan y empiezan a penetrar a través de la cutícula gracias a una combinación de presión mecánica y acción enzimática que va degradando ésta estructura externa, dentro del insecto, los hongos empiezan rápidamente a crecer y a producir toxinas que les permiten evadir la respuesta inmune del insecto (Asaff *et al.*, 2002; Corral *et al.*, 2006), el insecto modifica su comportamiento, deja de alimentarse, reduce su movimiento y finalmente muere (Devotto *et al.*, 2000; Corral *et al.*, 2006; Cornell University, 2007). Una vez que el hongo ha consumido todos los nutrientes y tejidos del insecto, emerge y produce esporas, continuando con el ciclo patogénico (Asaff *et al.*, 2002). En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresónos, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción (Corral *et al.*, 2006) el proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresónos se presenta de 12 a 18 horas postinoculación (Vicentini y Magalhaes, 1996). En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula, el mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinazas las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración la ninfa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto. esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, esto ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación (Hajek, 1994). Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuáles son sustancias de baja toxicidad pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003). Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y

membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino y tejido muscular la esporulación ocurre en 2 a 3 días dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente (Hajeck, 1994). Los síntomas que causan los entomopatógenos son variables: en *las ninfas* disminuyen sus movimientos, disminuyen la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. *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 (Lecuona, 1996).

2.3.2 Acción de *Metarhizium anisopliae* sobre la Población de Salivazo

Metarhizium anisopliae (Metsh.), pertenece División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Momiliales, Familia Moniliaceae, Género *Metarhizium* Según (Tañada y Kaya, 1993, Barnett y Hunter, 1998). Las infecciones con *Metarhizium anisopliae*, son similares en muchos aspectos a las causadas por otros hongos entomopatógenos. El género *Metarhizium* es conocido por ser parásito de insectos, aunque en el suelo puede actuar como saprofito (Barnett y Hunter, 1998; Corral *et al.*, 2006), puede llegar a atacar naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (Monzón, 2001), destacando al orden Coleóptera, Díptera, Hymenóptera, Lepidóptera y Homóptera (Tañada y Kaya, 1993; Alves *et al.*, 1998; France *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002). *Metarhizium sp* se caracteriza por poseer conidióforos hialinos y ramificados, los que forman una capa productora de esporas, sus conidias se encuentran compactadas en columnas, presentan forma oval alargada a cilíndrica, son hialinas o levemente pigmentadas, el micelio es de color verde oliváceo (Barnett y Hunter, 1998).

Los insectos muertos por *Metarhizium sp* son cubiertos completamente por un micelio de color blanco, el cual se torna de color verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001; Corral *et al.*, 2006). 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 (Lecuona, 1996).

2.3.3 Factores que Influyen en el Establecimiento y Acción de 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 y humedad relativa. (Lecuona, 1996)

2.3.3.1 Humedad Relativa

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 de los hongos entomopatógenos, una falta de humedad relativa adecuada puede perjudicar una epizootia (Lecuona, 1996). El estudio de Walstad et. Al. 1970, indica que la mayor germinación ocurre al 100% de humedad relativa y disminuye a 0 al 85% de humedad relativa niveles altos de HR son necesarios para la esporulación, un nivel de HR del 100% la esporulación ocurrió en cuatro días, pero a una HR de 92.5% se necesitó cinco o más días, mientras que la esporulación fue inhibida con humedad relativa menor del 90% (Nirula, 1957; Schaerfenberg, 1964; Walstad et. Al. 1970; Ferron, 1978, Sosa-Gómez y Alves 2000).

2.3.3.2 Temperatura

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para los hongos entomopatógenos debido a que puede afectar la germinación de las esporas, desarrollo, penetración del tubo germinativo, colonización y reproducción; los requerimientos térmicos de los hongos entomopatógenos son variables en función de la especie, cepa y fase de desarrollo, pudiendo ser perjudicial temperaturas mayores a 30 °C. (Lecuona,

1996). Las esporas de hongos entomopatógenos germinan a temperaturas entre 15 y 35 °C, siendo el rango óptimo entre 25 y 30 °C, y se requieren cuatro días para la esporulación de *Metarhizium anisopliae*, a temperaturas inferiores de 10 °C y superiores a 35 °C la esporulación es inhibida (Nirula, 1957; Schaerfenberg, 1964; Walstad et. Al. 1970; Ferron, 1978, Sosa-Gómez y Alves 2000).

2.3.3.3 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.), fotoperíodo y faja de luz ultravioleta germicida (Lecuona, 1996), la exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidias (Alves, 1986). Steinhaus (1949) citado por Nirula (1957) observó que 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.

2.3.3.4 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.

3 MA TEÑIALES Y MÉTODOS.

3.1 Localización del Área Experimenta

El presente trabajo se realizará en la Parroquia Puyo ubicada a 953 msnm. en los laboratorios de AGROCALIDAD y la Universidad Estatal Amazónica y a nivel de campo en el sector Los Ángeles 960 msnm.

3.2 Etapas de Investigación.

3.2.1 Laboratorio

3.2.1.1 Recolección de Insectos Parasitados.

Materiales.

- Tubo de ensayo.
- Pinzas.
- Algodón
- o Libreta de apuntes

Procedimiento:

La recolección de insectos parasitados se realiza mediante monitoreo sistemático en tres sectores, cada insecto parasitado presenta una forma inmóvil (momificados) con una capa verde-hierba oscuro, estos se recogen con pinzas, se coloca dentro de los tubos de ensayo y se los traslada al laboratorio, cada tubo se registra el día, la hora y el lugar donde se capturó para una posterior evaluación o identificación (Helmuth, 1997; Pollack, 1994), como se demuestra en la Fig. 1



Recolección de Insectos parasitados

3.2.1.2 Preservación de la Muestra en Cámara Húmeda.

Materiales.

- Caja Petry.
- Papel filtro
- Algodón.
- Toallas de papel.
- Pinzas
- Cámara de aislamiento.
- Hipoclorito de Sodio 5%

Procedimiento:

Desinfectar la cámara de aislamiento con alcohol antiséptico, esterilizar las pinzas por ebullición después con alcohol, colocar el papel filtro y algodón dentro de las cajas Petry, cada caja Petry es etiquetada con el nombre de la cepa y lugar donde fue capturado el insecto (Heimuth, 1997), los insectos parasitados son desinfectados previamente con hipoclorito de sodio al 5% por tres minutos, lavado con agua estéril por dos ocasiones, después se coloca dentro de las cajas Petry etiquetadas, para incentivar la esporulación y cosecha, como se demuestra en la Fig. 2



Fig. 2 Aislamiento de insectos parasitados en laboratorio.

3.2.1.3 Aislamiento de *Metarhizium sp.*

Materiales:

- Fuente de inculo Insecto parasitado
- Asa de siembra Nicron.
- Mechero de alcohol.
- Tubos de ensayo.
- Arroz
- . Vaso de precipitación de 500ml
- Jeringas.
- . Aguja hipodérmica.
- Oxitetraciclina de uso veterinario
- . Gasa y algodón.
- Papel aluminio
- Autoclave

Procedimiento:

Limpieza y desinfección del laboratorio con cloro al 5%, preparación de medio de cultivo arroz pre-cosido, se coloca el sustrato en tubos de ensayo de 20 cm, cada tubo con su respectivo tapón de algodón y gaza, se envuelve todo el material de trabajo en papel

aluminio y se colocan dentro del autoclave junto con el sustrato sólido arroz, a una presión de 15 psi por el tiempo de 15 a 20 minutos, con el aza de nicron se recolecta las esporas del hongo que están sobre el insecto, se coloca en un frasco de vidrio con agua esterilizada y 0.3 mi de oxitetraciclina y se agita, con una jeringa y la aguja hipodérmica extraemos 3 mi del preparado y sembramos en los tubos de ensayo donde se encuentra el sustrato sólido arroz, debidamente etiquetado (SESA, 2003) Según Helmuth (1997), para el cálculo de arroz por frasco utilizamos la siguiente formula:

$$C_A=(V_F \times 100)/750$$

Donde:

C_A = Cantidad de arroz utilizado

V_F = Volumen del frasco.

Según Helmuth (1997), para el cálculo de agua por frasco utilizamos la siguiente formula:

$$C_H=(V_F \times 160)/750$$
 Donde:

C_H = Cantidad de agua utilizado V_F =

Volumen del frasco

3.2.1.4 Preparación de Medios de Cultivo PDA y

SDA. Materiales.

- Cajas Petry
- Fuente de inóculo de *Metarhizium sp*
- Asa de siembra.
- Mechero de alcohol.
- Jeringas.
- Aguja hipodérmica.
- Oxitetraciclina de uso veterinario
- Papel aluminio
- Autoclave
- Medios de cultivo Papa-Dextrose-Agar (PDA) y Sabouraud-Dextrosa-Agar (SDA)
- Pipeta de 10 ml.
- Tubos de ensayo con tapa.

- Balanza
- Erlenmeyer
- Estufa
- Agua destilada esterilizada

Procedimiento:

Se pesan los medios de cultivos sintéticos PDA y SDA de acuerdo a la dosis pre establecida por la casa fabricante, en un erlenmeyer de 500 ml diluimos por separado los medios de cultivo en agua esterilizada, con una pipeta de 20 ml colocamos 15 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo con tapón para ser colocados posteriormente en las cajas Petry para la evaluación del crecimiento y características morfoculturales, esterilizamos en la autoclave con los diferentes materiales a una presión de 15 psi por el tiempo de 15 minutos (Helmuth, 1997; SESA, 2003) como se observa en la Fig. 3, Una vez esterilizado los medios de cultivo se coloca en caja Petry con 0.3 ml de oxitetraciclina por tubo para evitar contaminación por bacterias, siempre teniendo presente las normas de limpieza y desinfección de laboratorio.



b'ffl. 3. Preparación de medios do cultivo PDA y SDA.

3.2.1.5 Siembra de Cepas de *Metarhizium* sp.

Materiales.

- Cajas Petry
- Fuente de inóculo
- Erlenmeyer
- » Asa de siembra
- Jeringas
- Aguja hipodérmica.
- Oxitetraciclina de uso veterinario
- Mechero de alcohol.
- Cámara de aislamiento
- Guantes, mascarilla y mandil

Procedimiento:

Colocar las cajas Petry con los medios de cultivo PDA y SDA en columna cerca del mechero, con el asa de siembra recolectar las esporas del hongo y depositar en el erlenmeyer con agua esterilizada previamente inoculada 0.3 ml de oxitetraciclina, con una jeringa y la aguja hipodérmica extraemos 3 ml. del preparado con buena concentración de conidias viables y sembramos en los medios de cultivo PDA y SDA que se encuentran en las cajas Petry, se cubre con plástico adhesivo las cajas Petry para evitar la contaminación de las mismas, procedimiento realizado previo a la obtención de anillos de crecimiento micelial joven, cada caja Petry es etiquetada con el nombre, fecha y medio de cultivo que pertenece. Este proceso se lo realiza con guantes y mascarilla para evitar las contaminaciones (SESA, 2003; Tambo Roses, 2006), teniendo en cuenta las normas de limpieza y desinfección de laboratorio.

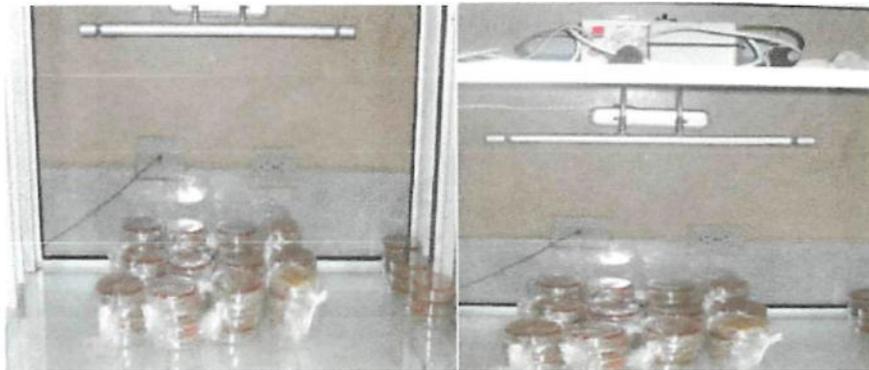
3.2.1.6 Incubación **del Cultivo.**

Materiales

- Cámara de incubación .

Procedimiento: i

Colocar las cajas Petry etiquetadas dentro de la cámara de incubación a una temperatura 24 - 25 °C. como se aprecia en la Fig. 4, al cabo de 5 - 6 días que es el tiempo de incubación se observa el crecimiento del micelio del hongo (Helmuth, 1997; SESA, 2003; Hall, 2004; Tambo Roses, 2006).



b'ij. 4. Inculinión do cultivo.

3.2.1.7 **Anillos de Crecimiento.**

Materiales

- Cámara de asilamiento.
- Antena de radio.
- Mechero de alcohol.
- Asa de siembra.
- Cajas petry y medios de cultivo PDA y SDA

- Antibiótico.
- Jeringuillas y agujas.
- Frascos de vidrio

Procedimiento:

Realizar la preparación de medios de cultivo, de la siembra realizada anterior mente de *Metarhizium sp* se recorta los micelios jóvenes con la base de una antena de radio de 0.60 cm. de diámetro, con el asa de siembra extraemos los recortes realizados, cada recorte es insertado en el centro de la caja Petry, se coloca en la cámara de incubación a 24 - 26 °C, cada 48 horas se mide el diámetro de crecimiento por cepas y medios de cultivo, obteniéndose 30 cajas Petry en PDA y 30 cajas Petry en SDA, se toma en cuenta el apareamiento del micelio, conidias, cosecha y características morfoculturales de las cepas, cada caja petry debe ser etiquetada (Helmuth, 1997; SESA.2003; Tambo Roses, 2006). teniendo en cuenta las normas de limpieza y desinfección de laboratorio.

3.2.1.8 Identificación Morfocultural del Hongo.

Materiales

- Estereoscopio.
- Microscopio.
- Calibrador Pie de Rey.
- Libreta de apuntes.
- Tabla de colores.
- Cinta adhesiva

Procedimiento:

Ajustar la caja Petry con cinta adhesiva de tal manera que esta no se mueva, con el calibrador Pie de Rey se mide el diámetro en forma de cruz cada 48 horas, por un mes, mediante la tabla de colores comparar el color del micelio y de las conidias bajo el estereoscopio, según la descripción de Mayea (2004) en base al libro Microbiología

Agropecuaria se describe las conidias y el micelio, el porcentaje de esporulación es determinado según las normas estatales para el control de calidad de productos de *Metarhizium anisopliae* que manifiesta que la germinación debe ser de un 85 - 90% para que sea buena y este libre de todo tipo de contaminación, el conteo de UFC (Unidades Formadoras De Colonias) se las realiza de acuerdo ha la normativa de la empresa Tambo Roses (2006), como se aprecia en la **Fig. 5**.



JICJK*

Fig. 5. Toma de diámetros de la colonia y caracterización microcultural

3.2.1.9 Producción Masiva.

Materiales

Mote.

Botellas de vidrio de gatorade.

Gasa

Algodón

Autoclave

Asa de siembra Niquelada.

Jeringuillas

Aguja hipodérmica

Procedimiento

Se pre-cocina el mote en un tiempo de 35 a 40 minutos previamente seleccionado, colocar 160 g de mote por botella de gatorade, se esteriliza en la autoclave con los materiales a utilizarse, se desinfecta la cámara de aislamiento y se procede a la siembra

de 2 ml de *Metarhizium sp* por botella de mote frente al mechero, colocamos en un cuarto de crecimiento las botellas para que el hongo pueda crecer en el sustrato sólido. Fig. 6



Fig. 6. Reproducción masiva de *Metarhizium sp* en sustrato sólido molido

3.2.2 Campo

Materiales.

- Cintas de colores.
- Bomba de aspersión a motor
- Flexómetro.
- Libreta de apuntes.

Procedimiento.

Las parcelas de estudio de 15 x 20 m con un promedio de 53 plantones de caña por parcela, delimitado el perímetro con cinta de color, con una separación de entre parcela de 7 m, para la liberación de *Metarhizium sp* se utilizó una bomba a motor, las

aplicaciones se realizaron de 6.30 a 8:30 horas de la mañana, con la finalidad de que los rayos solares no afectaran al hongo con la titulación establecida por parcela, la aplicación del entomopatógeno es en la tercera parte de la planta (área foliar), se toma en cuenta cada planta de caña como una repetición y las ninfas que se encuentren en cada planta de caña como la unidad experimental, no se considera a los adultos debido a su dinámica ya que estos saltan de planta en planta, el monitoreo se efectúa un día antes de la aplicación y se registra el número de ninfas por planta de caña, los monitoreos se realizaron a los 1. 14 días donde se determina la cantidad de ninfas afectadas por el hongo y los adultos que hayan sido contaminados, registrando los resultados de acuerdo a la hoja de campo de la Tabla 1, (Pollack. 1994, Alatorre R.R. 2002, SESA. 2003).

3.2.2.1 Hoja de Campo para Muestreo de Insectos

Tabla.1 Hoja de monitoreo para el control de *Mahanarva andigena* Pollack (1994) modificada

CAMPO		FECHA		HOJA DE INFORMACIÓN		
ÁREA—		DÍA—		HORA		
MAHANARVA ANDIGENA						
ZONA	ÁREA	T	TALLOS		% Infestación	% De parasitismo de
			infest	1 No	/planta	<i>Metarhizium sp</i>
			Infest.		Ninfa	Adulto
					Adulto	

Para el trabajo de laboratorio y campo se toma en cuenta los siguientes protocolos o normativas: AGROCALIDAD, Tambo Roses, **NC** - 72- 02, Richard Hall. 2004. Método para la producción de hongos entomopatógenos con calidad alta y estable de forma artesanal, Pollack Velásquez. M. 1994. Manual de las plagas de la caña de azúcar.

3.2.2.2 Ensayo del Control

3.2.2.2.1 Para el Laboratorio

Aplicamos un DCA con arreglo factorial 2x3 para comparar 2 medios de cultivo con 3 cepas diferentes de *Metarhizium sp*, la hipótesis planteada para la evaluación de las titulaciones son las siguientes.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (No existe diferencia en el crecimiento del hongo)

$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$ (Al menos una difiere).

Variable dependiente:

Crecimiento del hongo

3.2.2.2.2 Para el Campo

Aplicamos un DCA para comparar la Efectividad Biológica de tres titulaciones de *Metarhizium sp* en *Mahanarva andigena* en cultivo de caña, la hipótesis planteada para la evaluación de las titulaciones son las siguientes.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (No existe diferencia en la aplicación del producto)

$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Al menos una difiere).

Los tratamientos en estudio son los siguientes:

Testigo se aplicó agua. *Metarhizium sp*. Titulación

1.1×10^8 Conidias/ml *Metarhizium sp*. Titulación

4.8×10^7 Conidias/ml *Metarhizium sp*. Titulación

2.8×10^7 Conidias/ml

Cada tratamiento tiene cinco repeticiones

3.2.2.3 Determinación de la Efectividad Biológica de Tratamientos.

La Efectividad Biológica se determina por la siguiente fórmula. (Fórmula de Abbot Modificada, CIBA- GEIGI, 2000).

$$E_B = \frac{d_i - T_d}{C_d} \times 100$$

Donde:

E_B = Efectividad Biológica.

C_d = Insectos vivos en parcelas testigo tratadas después del tratamiento.

T_d = Insectos vivos en parcelas tratadas después del tratamiento.

Para la comprobación de los resultados se realizó procesamientos estadísticos mediante el paquete estadístico Statgraphics 15.2.12 soportado sobre el sistema operativo de Windows, en español, los análisis de varianza se realizaron mediante la prueba de Tukey al 5% para laboratorio y Duncan al 5% para campo. Al existir en ocasiones que el número de insectos resultaron cero se procedió a la transformación de datos obtenidos mediante la función $X \text{ transí} = \sqrt{0.5 + x}$

RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Registro de *Metarhizium sp* como Parásito Natural del Salivazo en Cultivo de Caña de Azúcar Sectores Las Américas y la Tarqui.

Los muestreos a los campos productivos de caña en el sector Las Américas, Tarqui, suministraron una amplia información en cuanto *Metarhizium sp* como entomopatógeno de salivazo, confirmando con los reportes del SESA (2003) la presencia de este hongo en cultivos de caña; de las muestras colectadas se logró realizar al menos un aislamiento puro por muestra de *Metarhizium sp* como lo confirma las experiencias propuestas (Tañada y Kaya, 1993; Alves *et al.*, 1998; France *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002; SESA, 2003);

4.1.1 Descripción de Cepas en PDA.

4.1.1.1 *Metarhizium sp* sector las Américas vía Tena Km.4 Vz CEPA 1 (Sr. Valverde)

Las características morfológicas de la colonia de *Metarhizium sp* en medio de cultivo PDA, se caracterizó por presentar un micelio de color blanco, hifas lisas y septadas, textura algodonosa, la colonia presenta una forma circular, borde regular, la coloración es verde oliva, color posterior miel, la colonia es semi-elevada con una textura algodonosa como se observa en la Fig. 7; el crecimiento del *Metarhizium sp* a las cero horas inicia con 0.60 cm. de diámetro y finalizó 7.72 cm. de diámetro a las 624 horas como se observa en la Fig. 8; Las observaciones microscópicas permitieron detectar conidióforos hialinos y ramificados, los que forman una capa productora de esporas, sus conidias se encuentran compactadas en columnas formando largas cadenas basipétalas comúnmente agrupadas en columnas prismáticas, presentan forma oval alargada cilíndrica comúnmente truncada en los extremos, son hialinas o levemente pigmentadas uninucleadas como se observa en la figura 7. El tamaño de las conidias de *Metarhizium sp* es de 6,0 u de largo y de 2 u de ancho.



Fig.7. Características morfológicas

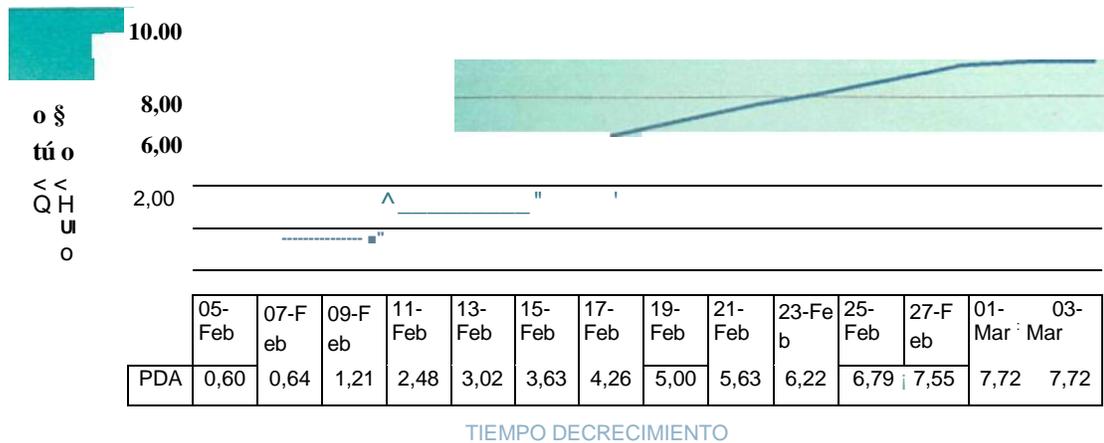


Fig. 8 Crecimiento del hongo *Metarhizium sp* sector las Américas Cepa CI (Sr. Valverde) en PDA

Demostrando que la cepa C1 del sector las Américas finca del Sr. Valverde por las características morfológicas y microscópicas pertenece al género *Metarhizium sp* lo cual fue corroborado por trabajos realizados por (Frobisher, 1976; Tulloch 1976; Brady 1979; **Barnetty Hunter**, Martínez, 1982; 1998; Samson et al, 1988; St Legar et al, 1992; Mayea, 2004)

4.1.1.2 *Metarhizium sp* sector las Américas vía Tena Km.4 V₂ Cepa 2 (Las Américas)

La caracterización morfológica de *Metarhizium sp* en medio PDA, se caracterizó por presentar un micelio de color blanco, hifas lisas y septadas, textura algodonosa, la colonia presenta una forma circular, borde regular de color verde oliva, color posterior miel. La

colonia es semi-elevada con una textura algodonosa como se observa en la Fig.9; el crecimiento de *Metarhizium sp* a las 0 horas empezó con 0.60 cm. de diámetro y a las 624 horas un diámetro de 7.83 cm. como se observa en la Fig. 10; las observaciones microscópicas permitieron detectar conidióforos hialinos y ramificados, los que forman una capa productora de esporas, sus conidias se encuentran compactadas en columnas formando largas cadenas basipétalas comúnmente agrupadas, presentan forma oval alargada cilíndrica comúnmente truncada en los extremos, son hialinas o levemente pigmentadas unimucleadas como se observa en la figura 9; el tamaño de las conidias de *Metarhizium sp* es de 6,0 u de largo y de 2 u de ancho.

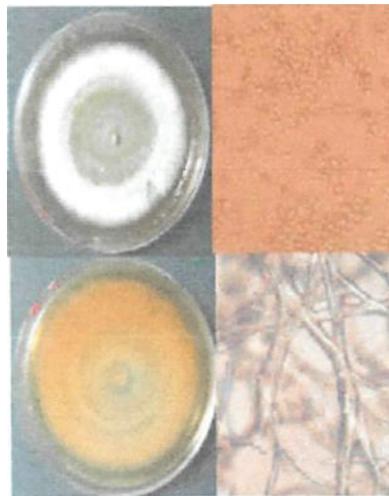


Fig. 9. Características inofoculturales

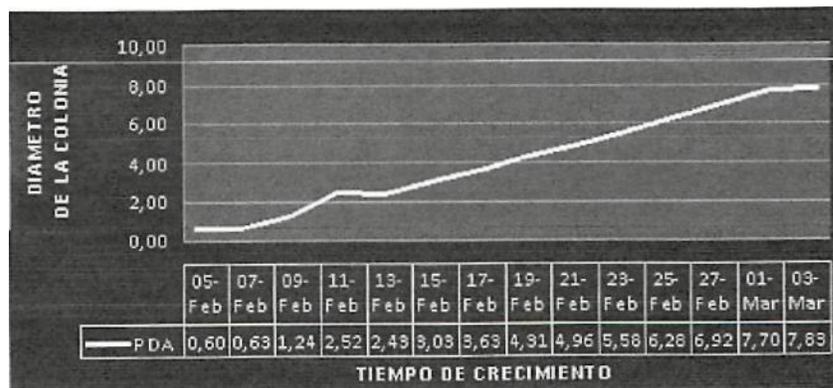
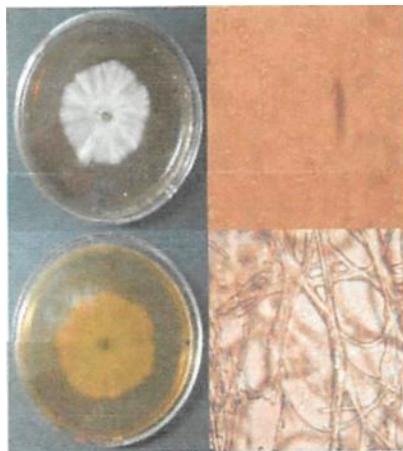


Fig. 10 (i) Crecimiento del titingó *Metarhizium sp* sector las Américas en medio de cultivo PDA

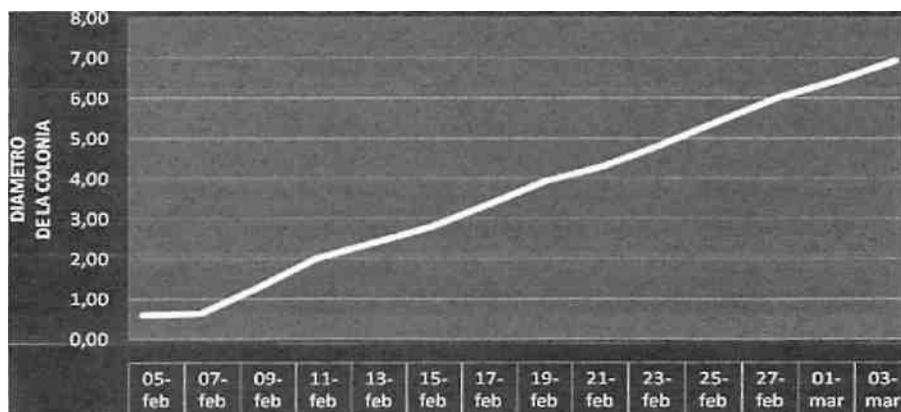
Indicando así que la cepa C2 del sector las Américas por las características morfológicas y microscópicas observadas en la investigación es *Metarhizium sp* corroborado con las investigaciones realizados por (Frobisher, 1976; Tulloch 1976; Brady 1979; Barnett y Hunter, Martínez, 1982; 1998; Samson et al, 1988; St Legar et al, 1992; Mayea, 2004)

4J. 13 Afefar/jz/umsp sector Tarqui CEPA 3. PDA

Las características morfológicas de las colonias de *Metarhizium sp* en medio de cultivo PDA, se caracteriza por presentar micelio de color blanco, hifas lisas y septadas, textura algodonosa, la colonia presenta una forma circular, borde irregular, color verde amarillento, color posterior miel, la elevación de la colonia es semi-elevada con una textura algodonosa como se observa en la figura 11, el crecimiento de *Metarhizium sp* a las cero horas empezó con 0.60 cm. de diámetro finalizando con 6.93 cm. de diámetro a las 624 horas como se observa en la Fig. 12; las observaciones microscópicas permitieron detectar conidióforos hialinos y ramificados, que forman una capa productora de esporas, las conidias se encuentran compactadas en columnas formando largas cadenas basipétalas comúnmente agrupadas, presentan forma oval alargada cilíndrica comúnmente truncada en los extremos, son hialinas o levemente pigmentadas unimucleadas como se observa en la figura 11. el tamaño de las conidias de *Metarhizium sp* fue de 6,0 u de largo y de 2 u de ancho.



Fi». II Características morfoculturales.



JWff

Fig. 12. Crecimiento del hongo *Metarhizium sp* sector Tarqni en medio de cultivo PDA

Deducimos que la cepa C3 del sector Tarqui por las características morfológicas y microscópicas presentadas en la observación es *Metarhizium sp* en concordancia con investigaciones realizadas por (Frobisher, 1976; Tulloch 1976; Brady 1979; Barnett y Hunter, Martínez, 1982; 1998; Samson et al, 1988; St Legar et al, 1992; Mayea, 2004)

4.2 Clasificación Taxonómica del Hongo Recolectado:

División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Momiliales
Familia	Monilíaceae
Género	<i>Metarhizium</i>

4.3 Selección del Medio de Cultivo para Confección del Cepario de *Metarhizium sp*.

Los medios de cultivo, por su composición, influyen en el desarrollo y esporulación de los hongos si estos son capaces de satisfacer con ellos sus necesidades nutricionales, requieren para su metabolismo fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, hierro, sodio, potasio y otros minerales, de todos, la fuente principal de materia prima la constituye el carbono. Los resultados de las observaciones de las colonias de *Metarhizium sp* a las

OOhoras hasta las 640 horas, en los distintos medios, permitió conocer el efecto de los componentes nutricionales en el crecimiento y desarrollo de este hongo y caracterizar el desarrollo cultural del mismo. Aspectos fundamentales para determinar el cepario a emplear en la reproducción masiva, debido a que se requieren cepas de un rápido crecimiento y un alto grado de esporulación.

La caracterización morfológica de *Metarhizium sp* en medios de cultivo, Papa Dextrosa Agar (PDA), se caracterizó por presentar un micelio de coloración blanca, presenta hifas lisas y septadas, textura algodonosa, la colonia presenta forma circular, borde regular en las cepas C1 y C2 e irregular en la cepa C3, la coloración de la colonia es verde oliva en las cepas C1 y C2, en la cepa C3 el colores verde amarillento, color posterior de la placa presenta un coloración miel para las tres cepas. La elevación de la colonia es semi-elevada con textura algodonosa como se observan en la Fíg, 13; el crecimiento de *Metarhizium sp* a las cero horas cepa C1 inició con 0.60 cm. de diámetro y finalizando con 7.7 cm. a las 624 horas, la cepa C2 a las cero horas inicia con 0.60 cm. de diámetro finalizando con 7.8 cm. a las 624 horas y la cepa C3 inicia con 0.60 cm. de diámetro finalizando con 6.9 cm. a las 624 horas como se observa en la Fíg. 14; Las observaciones microscópicas permitieron detectar conidióforos hialinos y ramificados, los que forman una capa productora de esporas. Sus conidias se encuentran compactadas en columnas formando largas cadenas basipétalas comúnmente agrupadas en columnas, presentan forma oval alargada cilíndrica comúnmente truncada en los extremos, son hialinas o levemente pigmentadas unimucleadas como se observan en la Fig. 13, el tamaño de las conidias de *Metarhizium sp* fue de 6,0 u de largo y de 2 u de ancho.



Fig. 13 Características morfo-culturales de *Metarhizium sp* en PDA.

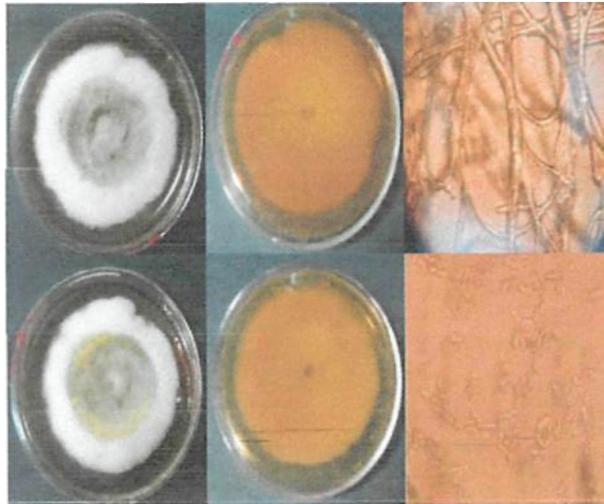


Fig. 15 Características culturales de *Sfetarkizmm sp* en SDA.

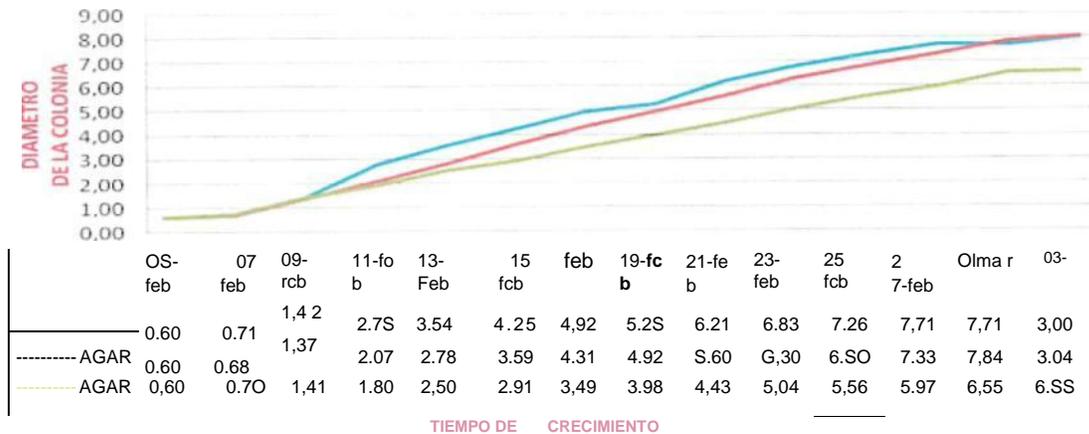


Fig. 16. Crecimiento del hongo *Metarhizium sp* en medio de cultivo SDA.

Afirmamos que para el crecimiento de *Metarhizium sp* se puede utilizar los medios de cultivo PDA o SDA para la conformación del cepario ya que no presentan diferencias en condiciones de laboratorio, por otra parte deducimos que por las características morfológicas del hongo tendríamos dos cepas en la Provincia de Pastaza debido a que las coloraciones de la cepa C3 es verde amarillento en comparación a las cepas C1 y C2 de coloración verde oliva y por su crecimiento en los medios de cultivo a emplearse, sin descartar la posibilidad de que existan otras cepas de entomopatógenos en la Amazonia según las investigaciones realizadas por (Frobisher, 1976; Tulloch 1976; Brady 1979;

Bustillo, 1987; Barnett y Hunter, Martínez, 1998; Samson et al, 1988; St Legar et al, 1992; NC 72-02, 1993; Brito e Irma, H, 1995; Mayea, 2004)

Tabla 2. (oncenlnuición de conidias ele *Metarhizium v/*> por mi.

Medios fie Cultivo	i	Conidias m 1		
	1 Horas i	024 lunas		
	i Cerz «is	C1	C2	j::3_ -•
SDA	i	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁶

La tabla 2, refleja la concentración de esporas de *Metarhizium sp* en los diferentes medios de cultivo probados, este es un parámetro que constituye una prueba para conocer la calidad biológica, demostrando que las mejores cepas fueron la C1 y C 2 con una concentración de 10⁸ conidias/ml. y la de menor esporulación fue la cepa C3 que registra 10⁶ conidias/ml.

En cuanto a los medios se demostró desde el punto de vista biológico que ambos son óptimos para el cultivo de este Entomopatógeno al presentar características similares en los parámetros estudiados.

Las concentraciones de esporas con niveles de 10⁸ en las cepas C1 y C2 cumplen con los parámetros de calidad que establece las NC 72 - 02, (1983) para la producción de cepas de hongos entomopatógenos, por lo que estas cepas pueden utilizarse para la reproducción masiva.

Según el AnexoL ANOVA para el crecimiento a las 624 horas presentando un p-valor inferior a 0,05 este factor tiene efecto estadísticamente significativo en crecimiento de las cepas a las 624 horas, más no en los medios de cultivo para el cepario a nivel del 95,0%

9 Según el Anexo 1. Prueba de Tukey (HSD) al 5,0% de riesgo a un nivel de confianza 95,0% aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente, deduciendo que existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas a las 624 horas, donde la cepa C1 y C2 sector Las Américas no presentan diferencias significativas entre sí, en comparación de la cepa C3 del sector Tarqui, bajo condiciones de laboratorio, lo que ratifica el resultado biológico obtenido.

Anexo 1. Prueba de Tukey 5,0% de riesgo, demuestra que no existe diferencia significativa entre medios cultivo a utilizarse para el cepario de *Metarhizium sp*, en condiciones de laboratorio, ratificándose estadísticamente nuestro resultado.

Afirmamos que la cepa C1 y C2 son óptimas para la aplicación en el campo por su concentración de esporas, crecimiento en los distintos medios de cultivo, que concuerda con las NC 72-02, 1993 las cuales manifiestan que los entomopatógeno a utilizarse deben tener una concentración mínima de 10^8 conidias/m.

4.4 Medio de Cultivo Sólidos para la Reproducción Masiva de *Metarhizium sp*.

La reproducción masiva de los hongos entomopatógenos es un proceso que requiere de medios de cultivos idóneos, que cumplan la finalidad de brindar a los microorganismos los nutrientes necesarios para su desarrollo, con una buena selección de ellos se favorece la capacidad de un rápido crecimiento y una buena esporulación aspectos que dependen en gran medida de factores nutritivos.

Podemos inferir que, en investigaciones anteriores realizadas por AGROCALIDAD en diferentes sustratos sólidos como cabecilla de arroz, trigo, quinua, mote y cebada se llegó a determinar que el maíz-mote es el sustrato idóneo para la reproducción masiva de *Metarhizium sp* (SESA, 2003). Permitiendo deducir que en 160 g de mote a utilizarse se obtuvieron 4.4 g de *Metarhizium sp*.

Para medir el efecto del tipo de soporte o medio natural sobre el desarrollo biológico del microorganismo es necesario realizar los controles de calidad propuestos por la Norma Cubana 72 -02, (1983), dentro de las cuales se recomiendan las pruebas de pureza, concentración de esporas, germinación o viabilidad y virulencia.

Por este motivo para fundamentar los resultados obtenidos anteriormente por AGROCALIDAD reevaluamos la pureza, crecimiento y concentración de esporas en el medio definido para realizar la reproducción masiva, obteniendo los siguientes resultados:

4.4.1 Pureza.

La evaluación del parámetro pureza en sólidos, se expresan en la Tabla 6; se contabilizó el número de frascos con crecimiento puro de *Metarhizium sp* y el número de frascos contaminados al finalizar el proceso, se observó un 100% de crecimientos puros, lo cual valida lo acertado de este medio para su uso en la reproducción masiva de *Metarhizium sp*.

?

Tabla. 3. Crecimiento de *Metarhizium sp* en sustrato sólido mote.

	Solidos
Crecimientos puros	70
Contaminados	0
Sin crecimiento	0
Total de frascos	70

4.4.2 Crecimiento.

fr

En el caso de los medios sólidos no se evaluó el crecimiento superficial producto de la homogeneidad que se crea al inocular el sustrato, aspecto que no hace posible un crecimiento superficial del microorganismo sino que cubre todas las partículas del soporte, solo se evaluó el período de tiempo en días entre la inoculación y el comienzo del crecimiento hasta la cosecha. El número de días para iniciar el crecimiento a partir de la inoculación y la máxima esporulación en el soportes sólidos, se expresan en la Tabla 7, donde se logra en un corto período de tiempo la aparición de micelio y conidias lo que ratifica lo óptimo del uso del mote como sustrato de producción masiva del entomopatógeno.

Tabla. 4. Fases de crecimiento de *Metarhizium sp* en días

DESARROLLO	DÍAS
MICELIO	3
CONIDIOS	5
COSECHA	20

^

4.4.3 Concentración de esporas /mi.

La concentración de esporas obtenido en el sustrato inoculado con *Metarhizium sp* fue de 10^8 conidias/ml cumpliendo los parámetros exigidos en la NC - 72- 02.

4.5 Efectividad biológica de *Metarhizium sp.* en el control del salivazo (*Mahanarva andigena*) en el cultivo de la caña de azúcar.

La Efectividad Biológica de la cepa nativa del hongo entomopatógeno *Metarhizium sp* en *Mahanarva andigena* en condiciones de campo se reflejada en la Fig 17; donde se observa que la titulación con una concentración de 1.1×10^8 conidias/ml a los 7 días alcanzó una mortalidad de 22.10% de la población y a los 14 días un 90.95% de mortalidad en comparación con la titulación de 4.8×10^7 conidias/ml alcanzando a los 7 días una mortalidad de 20.30% de la población y a los 14 días un 69.48% de mortalidad y la titulación de 2.8×10^7 conidias/ml alcanzando a los 7 días una mortalidad de 15.90% de la población y a los 14 días un 46.10% de mortalidad, cabe mencionar que la titulación 1.1×10^8 conidias/ml está dentro de los parámetros de la empresa Biotecnología agrícola en Biopreparados de *Metarhizium anisopliae* donde manifiestan que la **Efectividad** Biológica del hongo en condiciones de campo deberá ser mayor del 70%; la titulación 4.8×10^7 conidias/ml y 2.8×10^7 conidias/ml de menor virulencia quedarían descartadas por no cumplir con este parámetro establecido, demostrándose de esta forma la Efectividad Biológica del control que realiza el hongo entomopatógeno *Metarhizium sp* sobre *Mahanarva andigena* a una titulación de 1.1×10^8 , debido que alcanzo a los 7 días posterior a la segunda aplicación una Efectividad Biológica de 90%. parámetro que se considera excelente para un entomopatógeno en condiciones de campo según las normativas internacionales, siendo corroborados nuestros resultados estadísticamente como se observa en la Figura 17, 18 y el Anexo 2.

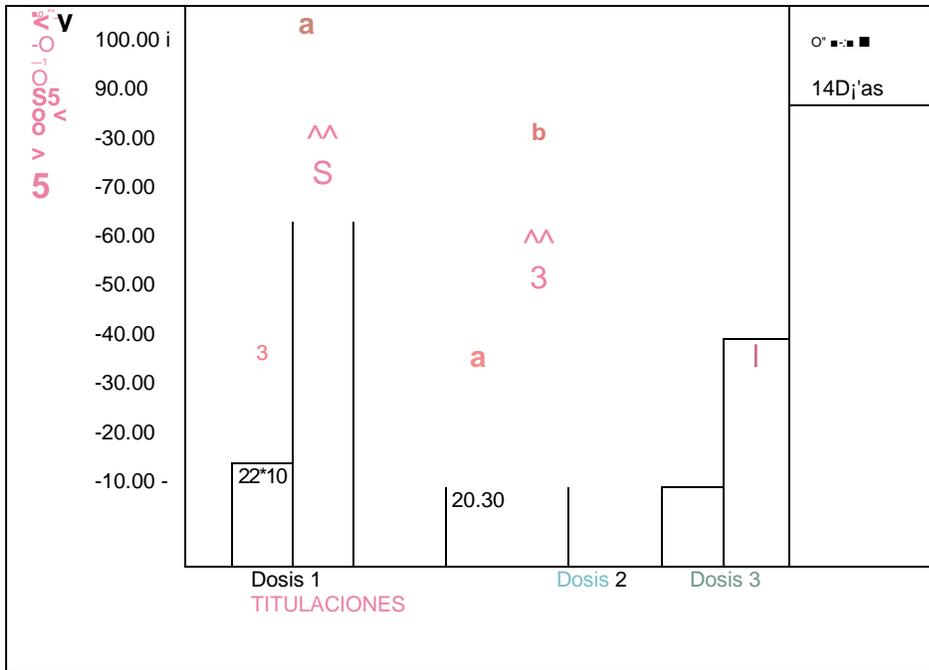


Fig. 17 Efectividad Biológica de tres titulaciones de *Metarhizium sp.* Medias con letras desiguales difieren según Duncan $p < 0,05$, E.S.= 1.3



Fig. 1S Efectividad Biológica de *Metarhizium sp.* En ninfas y adultos de *Mahanarva andigena*

Ninfas

5. CONCLUSIONES

El entomopatógeno aislado de las Américas y la Tarqui por sus características morfológicas corresponden a *Metarhizium spp.*

Los medios de cultivos (PDA Y SDA) resultan óptimos para la confección del cepario de *Metarhizium sp.*

El soporte sólido Maíz Mote para la reproducción masiva artesanal del *Metarhizium sp.* Cumple los parámetros de calidad establecidos.

Se determinó que la titulación más efectiva para el control de *Mahanarva andigena* en la titulación 1.1×10^8 por obtener una efectividad Biológica del 90% con intervalos de aplicación cada 7 días

6. RECOMENDACIONES

Aplicar los resultados obtenidos para el mejoramiento del estatus fitosanitario de *Mahanarva andigena* en el cultivo de la Caña de Azúcar a una concentración de 1.1×10^8 en dos aplicaciones con intervalo de 7 días

Continuar los estudios de prospección de cepas nativas el control de ésta plaga.

Definir épocas de liberaciones de *Metarhizium sp* para control biológico *Mahanarva andigena*

Implementar un centro de reproducción masiva tipo artesanal de *Metarhizium sp.*

7. BIBLIOGRAFÍA. Alves, S.B. Controle microbiano de insectos. Editora

Manóle, Brasil 1986; 407.

Asaff, A.Y.; Reyes, V. j López y López, M. de la Torre. Guerra entre insectos y microorganismos. Una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva 2002; 21:291-295.

Barnett, H. and B, Hunter. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Aps press, Minnesota, USA 1998; 218.

Bustillo, A. E. Uso de entomopatógenos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica 1987; 32-50p.

Binaco, R. Disposición espacial de *Aeneolamia* spp. (Homoptera: Cercópidae) en praderas de gramíneas tropicales. Tesis MC. Chapingo, México. CP 1982; 123.

Bodegas Várela, P.R. Aspectos biológicos sobre la mosca pinta de los pastos, con énfasis en el periodo de incubación de los agalháes de *Aeneolamia, mahanarva*. Tesis MC. Monterrey, N.L ITESM 1973; p111.

Brito, R. R.; Irma, H. Empleo de un nuevo pre- inculo para la producción de Entomopatógenos. III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas. INISAV. Cuba 1995; 82p.

Carballo, M.; Guharay, F. Control biológico de plagas agrícolas. Managua, NI. CATIE 2004; 232p. (Serie Técnica: Manual Técnico No. 53).

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cercópidos de los pastos en América Tropical. Biología y control: guía de estudio. Cali, Colombia. CIAT 1982; p51

Cornell University Biological control. A guide to natural enemies in North America.

Consultado

el

06/06/08

<http://www.nvsaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/fungi.html>.

Coronado Padilla, R. Memoria de la campaña contra la mosca pinta. Coyoacán, México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) 1978; 126.

Coronado Padilla, R.; Sosa Esquiliano, E. Campaña contra la mosca pinta y la escama algodonosa de los pastos. Fitófilo 1966; 50:5-15.

Corral, G.A.; Romero, C; Radrigan, T.; Zaviezo. Las virtudes de lo hongos entomopatógenos. Agronomía y forestal 2006; 30:12-15.

Cultivo de la Caña Proyecto SICA-MAG-BIRF. 2000

De Bach, P. Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas. Ed. Continental, México D.F, México 1968; p916

Devotto, L; M. Gerding.; A. France. Hongos Entomopatógenos: Una Alternativa para la Obtención de Biopesticidas. Bioléche 2000; 23:30-33.

DIECA. Manejo integrado del salivazo en el cultivo de la caña de azúcar. Programa de Entomología. Grecia, CR 2004; 16.

Fagan, E.B.; Kuitert, L.C. Biology of the two-lined spittiebug, *Prosapia bicincta*, on Florida pastures (Homoptera: Cercopidae). The Florida Entomologist 2000; 52(3): 199-206.

Ferron, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungí. Annual Review of Entomology 1978; 23:409-442.

Fewkes, D.W. Number of nymphal instars of the sugar-cane froghopper. Nature 1960; 188(4745):167-168.

Fontes, E.G; Pires, C.S.S; Sujii, E.R. Mixed risk-spreading strategies and the population dynamics of a Brazilian pasture pest, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae). Journal of Economic Entomology 1995; 88(5): 1256-1262.

France, A.; M. Gerding.; A. Sandoval.; S. Espinosa y E. Vivanco. Patología de Insectos. Serie Quilamapu N° 122. Ed. INIAQuilamapu, Chillan, Chile 1999; 119p.

France A.; M. Gerding.; A. Sandoval. Control de insectos mediante hongos y nemátodos. Chile Agrícola 1999; 24(238):121-122.

Frobisher, M. Microbiología. Introducción a los microorganismos como una referencia especial a los Procariones. Edición Reimpresión. Barcelona 1976; 275p.

Guagliumi, P. Pragas da cana-de-acúcar, Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro, Brasil. Instituto do agalh e do Álcool, agalhá administrativa. Canaviera no. 10 1972/73; 622.

Gómez Bonilla, Y. Efectividad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin en el control de especies de Cercopidae (Homoptera) en *Brachiaria ruzizensis*. Tesis Mag. Se. San José, CR, UCR 2002; 105.

Hajek, A.E; Leger, R.J. St. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology 1994; 39:293-322.

Hawksworth, D. The fungal dimensión of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research 1991; 95(6):641-655.

Helmuth. W. Rogg. Guía practica de producción masiva del entomopatógeno *beauberia bassiana* para el control biológico de insectos plkaga en Bolivia. Santa Cruz de la Sierra Bolivia 1997

Helmuth. W. Rogg. M.I.P. en cultivos de la Amazonia. Imprenta Mosaico, Quito-Ecuador 2001; 200.

Herrera, F.; M. Carballo.; P. Shannon. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bermisia tabaci*, en laboratorio. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 1999; 54:37-43.

Holmann, F.; Peck, D. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: a first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotropical Entomology* 2002; 31 (2): 1-10.

Juárez, Benito. Control biológico de mosca pinta y barrenador de la caña de azúcar en el municipio de cárdenas 2005

Ledesma Zamora, O. Pastaza una provincia que apasiona. Edición 2004; p95

Lecuona, R.E.; ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. Talleres gráficos Mariano 1996; 338.

Mayea Silverio. Microbiología Agropecuaria Tomo I. Los hongos, los mohos 2004; p89-164.

Martin, R.M.; Cox, J.R.; Alston, D.G.; Ibarra, F.F. Spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) life cycle on buffelgrass in northwestern México. *Annals of the Entomological Society of America* 1995; 88(4):471-478.

Mendoza A.F. Manejo integrado de plagas de caña de azúcar en Brasil. Tercera mesa redonda latinoamericana de fitosanidad de la caña de azúcar. Barquisimeto, Venezuela 1989; p. 7.

Microsoft® Encarta®. ©. Microsoft Corporation 2007

Miranda, E.; Kawamura, N. Estudio de la binomía de salivazos (Cercopidae) en potreros con pasto *Brachiaria*, con miras al desarrollo de su manejo integrado. Artículo de investigación, Centro Tecnológico Agropecuario en Bolivia 2003; 2:21-24.

Monzón, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 2001; 63:95-103.

Niruia, K.K. Observations on the green muscardine fungus in populations of *Oryctes rhinoceros* L. *Journal of Economic Entomology* 1957; 50(6):767-770.

Norma Cubana 72-02. Biopreparados entomopatógenos. Métodos de ensayos. 1993. P.50.

Pass, b.c; reed, j.k. Biology and control of the spittiebugs *prosapia bicinta* in coastal Bermuda grass. Journal of economic entomology 1965; 58(2);275-278.

Peck, D.C. Natural history of the agalhães *Prosapia nr. Bicincta* (Homoptera: Cercopidae) in association with dairy pastures of Costa Rica. Annals of the Entomological Society of America 1998; 91(4):435-444.

Peck, D.C. Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homoptera: Cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología 2001; 27 (3-4): 129-136.

Pérez García, G. Clasificación taxonómica, características anatómicas y morfológicas de la caña de azúcar, fisiología del crecimiento y desarrollo 2007.

Pollack Velásquez. M. Manual de las plagas de la caña de azúcar. Perú - Lima. Editorial Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos 1994; 1

Richard Hall. Método para la producción de hongos entomopatógenos con calidad alta y estable de forma artesanal. Colectivo de investigadores del LPSV. De Villa clara FAO 2004.

Rodríguez, S.; J. Rodríguez.; D. Riestra.; J. Villanueva y D. Rodríguez. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 2002; p64:34-40.

Rodríguez, Ch.J.; Castro V.U; Morales R.A.; Peck, D.C. Biología del salivazo *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), nueva plaga de gramíneas cultivadas en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 2003; 29(2): 149-155.

Sandino D.V.M. Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE 2003; 26p.

Schaerffenberg, B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarrhizium*. Journal of Insect Pathology 1964; 6:8-20.

Servicio ecuatoriana de sanidad agropecuaria (SESA) 2003

SESA. Proyecto Para la Producción de Bioplaguicidas para el Control Biológico de Insectos Plaga en la Agricultura 2003; Sin Publicar

sica.gov.ec

Sosa Gómez, D.R; Alves, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Bauveha bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). Anais da Sociedade agalháesca do Brasil 2000; 29(3):515-521.

Tañada, K. and H. Kaya. Insect Pathology. Academic Press, New York, USA. 1993; p616

Tambo Roses. Procedimiento para el conteo de UFC (Unidades formadoras de Colonias) 2006.

Tanzini, M.; S. Alves.; A. Setten y N. Augusto. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 2001; p59:15-18.

Vargas Picado, O. Estudio sobre la baba de culebra *Prosapia agalhae* (Homoptera: Cercopidae) y un ensayo sobre su combate en el pasto kikuyu (*P. clandestinum* Hochst.). Tesis Ing. Agr. San José, CR. UCR 1970; p75.

Velasco P, H.; Hernández Tafoya, R.; Flores Flores, J.D.; Ochoa Ramírez, N.; Sifuentes A.J.A. La mosca pinta o salivazo: Datos sobre su agalháe, ecología y control. México, D.F. Dirección General de Sanidad Vegetal 1972; p14.

Vicentini, S; Agalhaes, B.P. Infection of the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 1996; 25(2):309-314.

i§

%

Walstad, J.D.; Anderson, R.F.; Stambaugh, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology* 1969; 16:221-226.

www.wikipedia.org

Zambrano, C; Sepúlveda, M. C; Zambrano, E. B.; y Molina, N. Hongos entomopatógenos en Venezuela: *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sor., caracterización, formulación, producción y aplicación. En: Tercera mesa redonda Latinoamericana de fitosanidad de la caña de azúcar, Barquisimeto, Venezuela 1989; P.32

8. ANEXOS

Anexo 1. ANOVA y prueba de Tukey para el crecimiento y medios de cultivo a las 624 horas de *Metarhizium sp* en medios de cultivo PDA y SDA

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Ualor
EFFECTOS PRINCIPALES	3,49207	2 1	1,74603	58,58	0,0000
R:CEPR B:MED 10	0,00653333	8	0,00653333	0,22	0,6522
RESIDUOS	0,2381167		8,0298083		
TOTFIL (CORREGIDO)	3,73707	11			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Prueba de Tukey a las 624 horas en cepas de *Metarhizium sp*

Método: 95 CEPA	, porcentaje 0 Recuento	HSD de Tukey Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	6,755	0,0863255	X
1	4	7,86	0,0863255	X
2	4	7,935	0,0863255	
Contraste			Diferencias	+/- Límites
1 - 2			-0,075	0,348245
1-3			*1,105	0,348245
2-3			*1,18	0,348245

* indica una diferencia significativa.

Prueba de Tukey a las 624 horas en medios de cultivo PDA y SDA.

Método: 95 ÍMEDIO	, porcentaje 0 Recuento	HSD de Tukey Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	7,49333 6	0,0704844	X
2	7,54		0,0784844	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
1 - 2			-8,046667	8,229863

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2 Prueba de Duncan para la Efectividad Biológica a los 7 días de la segunda aplicación.

Contraste Múltiple de Rangos para EFECTIVIDAD BIOLÓGICA según TITULACIÓN

Método: 95,0 porcentaje Duncan

TITULACIÓN	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	5	46,102	5,27908	
2	5	69,ii8i4	X 5,27908	
1		90,958	X 5,27908	
			X	
Contraste			Diferencias	
1 -			*?1 ,47J*	
? 1-3			*****, 856	
2-3			«23,382	

* indica una diferencia significatiua.