

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

**LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA  
PATOGENICIDAD Y SELECCIÓN *IN VITRO* DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y  
SUS METABOLITOS PARA EL MANEJO DE *Pseudococcus elisae* (HEMÍPTERA:  
PSEUDOCOCCIDAE) EN BANANO (MUSA AAA)”**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN DE TESIS SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DEL  
TRIBUNAL EXAMINADOR DE LA ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS PARA OPTAR  
AL GRADO DE LICENCIADA EN INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**POR**

**KAREN GRACIELA SOLERA GONZÁLEZ**

**CAMPUS HEREDIA, COSTA RICA**

**FEBRERO, 2017**

Trabajo de graduación presentado para optar al grado de Licenciada en Ingeniería Agronómica con énfasis en Agronegocios y al título de Ingeniero Agrónomo

Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciada en Ingeniería Agronómica.

### **Tribunal Examinador**

---

M. Sc. Margaret Pinnock Bradford  
Representante del Decanato de la Facultad  
De la Tierra y el Mar

---

Lic. Steffany Orozco Cayasso  
Representante Escuela de Ciencias Agrarias

---

M. Sc. Alejandro Rodríguez Morales  
Director de Tesis

---

Dr. Roger Muñoz Hernández  
Asesor

---

M. Sc. Allan González Herrera  
Asesor

---

Bach. Karen Graciela Solera González  
Estudiante

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar una metodología para evaluar el efecto de propágulos y metabolitos secundarios de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Purpureocillium lilacinum*), sobre la cochinilla harinosa, *Pseudococcus elisae*, bajo condiciones de laboratorio. Inicialmente se evaluaron tres diferentes vegetales: chayote (*Sechium edule*), camote (*Solanum batatas*) y tacaco (*Frantzia tacaco*), como sustrato para el acondicionamiento de las cochinillas en sus respectivas unidades experimentales. En esta prueba se evaluó la mortalidad y la producción de cera y ovisacos por parte del insecto. Posteriormente, se evaluó la capacidad de diferentes productos dispersantes (Traspore<sup>®</sup>, Limonoil<sup>®</sup>, Break thru<sup>®</sup> y Cosmo-IN d<sup>®</sup>), como coadyuvantes para la humectación de la capa cerosa del insecto, y para determinar su posible efecto sobre la mortalidad de los insectos y la germinación de los propágulos (conidios) de los hongos. Se utilizaron modelos experimentales completamente al azar, y los datos se analizaron mediante regresión logística (SAS, versión 9.3). El chayote mostró ser el mejor sustrato para el acondicionamiento de los insectos, pues al octavo día luego de su inoculación en los vegetales, presentó el menor porcentaje de mortalidad (5,3%;  $P > 0,5897$ ) y además propició condiciones que permitieron una mayor producción de cera y ovisacos. Los dispersantes que lograron humectar la capa cerosa del insecto fueron Break thru<sup>®</sup> y Cosmo-IN d<sup>®</sup>, a concentraciones al 0,06% y 0,8%, respectivamente. Se eligió el dispersante Break thru<sup>®</sup> por haber propiciado la menor mortalidad (6%) sobre el insecto al octavo día ( $P > 0,083$ ), en comparación con Cosmo-IN d<sup>®</sup>. Asimismo, Break thru<sup>®</sup> no afectó la germinación de los conidios ( $P > 0,1951$ ) de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii* y *P. lilacinum*.

Los hongos se evaluaron a través de 6 experimentos y para su reproducción se utilizó un sistema bifásico. A partir de la fase líquida del medio inductor se extrajo el filtrado crudo conteniendo los metabolitos secundarios (M), el cual se evaluó al 5% de concentración (v/v); y a partir de su fase sólida, se obtuvieron los propágulos (P) infectivos, que se evaluaron a una concentración de  $5,0 \times 10^7$  conidios/ml (100% viables). La mitad de los cultivos se les adicionó quitina coloidal (tratamientos MQ y PQ), ó cutícula extraída de *Galleria mellonella* (tratamientos MP y PP), con el objetivo de estimular la producción de enzimas líticas por parte de los hongos, y determinar su posible efecto sobre la mortalidad del insecto. Se utilizó

un diseño experimental factorial 5x3x1 (medio inductor x aislamiento x testigo), para cada bioensayo se le realizó un análisis estadístico utilizando el modelo lineal generalizado, usando la función lógito como función vinculante [Lógito (x) = log [p (x) / (1-p (x))]].

El análisis individual de los bioensayos, los aislamientos y los tratamientos, mostraron diferencias estadísticas respecto al testigo ( $P < 0,005$ ). Además, no se encontró interacción entre los tratamientos y los aislamientos de hongos entomopatógenos ( $P \geq 0,2618$ ); y tampoco al considerar los seis bioensayos en su conjunto ( $P = 0,2592$ ). Los aislamientos que mostraron una mayor mortalidad fueron: ENTO-05 (*B. bassiana*), LL-56 (*L. lecanii*), ENTO-29 (*M. anisopliae*) y ENTO-01 (*B. bassiana*), con porcentajes mortalidad del 49,4%, 42,1%, 38,5% y 38,3% respectivamente, difiriendo estadísticamente ( $P < 0,0001$ ) de los otros aislamientos. La adición de quitina coloidal permitió al tratamiento con propágulos (PQ) de los hongos, alcanzar la mayor mortalidad sobre el insecto con un 41,7%, difiriendo significativamente ( $P < 0,0003$ ) de los otros tratamientos (PP, MQ y MP). Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la adición de quitina induce en los hongos a una mayor mortalidad sobre el insecto, lo cual a su vez hace suponer que esto es el resultado de una mayor actividad enzimática que degrada a este biopolímero estructural presente en la cutícula del insecto, y lo predispone a ser infectado por los hongos. Asimismo, la investigación permitió desarrollar un sistema práctico para evaluar el efecto de los hongos y sus filtrados, sobre la cochinilla harinosa, *P. elisae*.

**Palabras claves:** banano, control biológico, *Pseudococcus elisae*, hongos entomopatógenos, quitinasas, proteasas.

## ABSTRACT

The present study was aimed to develop a methodology to evaluate the effect of propagules and secondary metabolites of 16 isolates of entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* and *Paecilomyces lilacinus*) on the mealybug *Pseudococcus elisae* under laboratory conditions. Initially three different vegetables were evaluated: squash (*Sechium edule*), sweet potato (*Solanum batatas*) and tacaco (*Frantzia tacaco*), as substrates for the conditioning of the mealybugs in their respective experimental units. In this test the mortality rate and the production of wax and ovisac by the insect were evaluated. Then, the ability of different dispersant products (Traspore®, Limonoil®, Break thru® and Cosmo-IN d®) as coadjuvant for the wetting of the waxen layer of the insect was evaluated as well as determining its possible effect on the mortality of the insects and the germination of the propagules (conidia) of the fungi. It was used fully randomized experimental models, and data were analyzed by logistic regression (SAS, version 9.3). The squash showed to be the best substratum for the conditioning of the insects, since at the eighth day after the inoculation in the vegetable, it presented the lowest percentage of mortality (5,3%;  $Pr > 0,5897$ ) and also it propitiated conditions that allowed a higher production of wax and ovisac. The dispersants that could wet the waxen layer of the insect were Break thru® and Cosmo-IN d® at concentrations of 0.06% and 0.8%, respectively. The Break thru® dispersant was chosen because it caused the lowest mortality (6%) of the insects at the eighth day ( $P > 0.083$ ), compared to Cosmo-IN d®. Also, Break thru® did not affect the germination of the conidia ( $Pr > 0.1951$ ) of *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii* and *P. lilacinus*.

The fungi were evaluated through six experiments and for their reproduction a biphasic system was used. From the liquid phase of the inducing medium, the crude filtrate with the secondary metabolites (M) was extracted, which was evaluated at 5% concentration (v/v); and from its solid phase, infective propagules (P) were obtained, which were evaluated at a concentration of  $5.0 \times 10^7$  conidia/ml (100% viable). Half of the cultures were spread with colloidal chitin (MQ and PQ treatments), or cuticle extracted from *Galleria mellonella* (MP and PP treatments), with the objective of stimulating the production of lytic enzymes by the fungi, and determining their possible effect on insect mortality. A 5x3x1 factorial experimental (5 inducing medium x 3 isolates x 1 control), design was used for each bioassay. The

statistical analysis was performed using the generalized linear model, applying the logit function as a binding function [ $\text{Log}(x) = \log [p(x) / (1-p(x))]$ ].

The individual analysis of the bioassays, isolates and treatments, showed statistical differences regarding the control ( $P < 0.005$ ). In addition, no interaction was found between treatments and isolates of entomopathogenic fungi ( $P \geq 0.2618$ ); and neither when considering the six bioassays in its set ( $P = 0.2592$ ). The isolates that showed a higher mortality were: ENTO-05 (*B. bassiana*), LL-56 (*L. lecanii*), ENTO-29 (*M. anisopliae*) and ENTO-01 (*B. bassiana*), with mortality rates of 49.4%, 42.1%, 38.5% and 38.3% respectively, differing statistically ( $P < 0.0001$ ) from the other isolates. The addition of colloidal chitin allowed the treatment with propagules (PQ) of the fungi to reach the highest mortality of the insects with 41.7%, differing significantly ( $P < 0.0003$ ) from the other treatments (PP, MQ and MP). The obtained results allowed verifying that the addition of chitin induces in the fungi a higher mortality rate of the insect, which in turn suggests that this is the result of a higher enzymatic activity that degrades this structural biopolymer present in the cuticle of the insect and predisposes it to be infected by the fungi. Also, the research allowed developing a practical system to evaluate the effect of the fungi and their filtrates on the mealybug *P. elisae*.

**Key words:** banana, biological control, *Pseudococcus elisae*, entomopathogenic fungi, chitinases, proteases.

## DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de los Ángeles por darme la fortaleza y sabiduría para concluir esta tesis.

A mis padres, Dinorah González Jiménez y Rafael Solera Solera, por todos los sacrificios, esfuerzos realizados y el amor que siempre me han dado, quienes hoy son mi razón de ser.

A mis hermanos Josué Solera González y Sebastián Solera González, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional.

A mi tía Liliana Solera Solera quien ante difíciles obstáculos ha sabido ser una mujer luchadora y llena de fortaleza.

A Lizbeth Amador Moraga, quién llena mi vida de energías y motivación para concluir esta labor.

Y a todas las personas que de alguna manera me han apoyado a concluir este proceso.



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.) y al director del Centro de Investigaciones Dr. Jorge Sandoval por la oportunidad de realizar el proyecto de tesis.

Al departamento de control biológico de CORBANA por su disposición y colaboración en este proceso, especialmente al jefe de laboratorio y director de tesis M.Sc Alejandro Rodríguez Morales, por brindarme la oportunidad de realizar dicha investigación, sus consejos, paciencia, confianza, apoyo y su permanente disposición a escucharme y ayudarme. También a los asistentes de laboratorio Juan Carlos Retana Guzmán y Omar Gabriel Vega Molina, les agradezco profundamente la amistad, el entusiasmo y colaboración otorgados durante este proceso.

A la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica, por la formación profesional.

A los asesores de tesis, el Dr. Roger Muñoz Hernández y M.Sc Allan González Herrera, por todo el tiempo, dedicación y sus consejos durante el proceso de tesis.

Al M.Sc Fabio A. Blanco, por el tiempo, la dedicación, los consejos y el apoyo durante todo el proceso de investigación.

A todas esas personas, que de alguna forma participaron y ayudaron a que la investigación se llevara a cabo.

## LISTA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	4
LISTA DE CONTENIDOS .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. OBJETIVOS .....	20
2.1 Objetivo general .....	20
2.2 Objetivos Específicos .....	20
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	21
3.1 Generalidades del cultivo del banano.....	21
3.2 Cultivo del banano en Costa Rica .....	21
3.3 Control biológico.....	25
3.3.1 Hongos entomopatógenos .....	25
3.3.1.1 Proceso de infección de los hongos entomopatógenos.....	26
3.3.1.2 Algunos hongos entomopatógenos utilizados en el control biológico .....	29
3.3.1.3 Principales metabolitos involucrados en el proceso de infección de hongos entomopatógenos .....	31
3.3.1.4 Utilización de dispersantes en la aplicación de hongos entomopatógenos	35
3.4 Cochinilla harinosa <i>Pseudococcus elisae</i> .....	35
3.4.1 Clasificación taxonómica.....	37
3.4.2 Biología y hábitos de <i>Pseudococcus elisae</i> en plantas de banano .....	37
3.4.3 Ciclo de vida de <i>Pseudococcus elisae</i> .....	38
3.4.4 Métodos de manejo de <i>Pseudococcus elisae</i> .....	39
3.4.4.1 Manejo cultural.....	39
3.4.4.2 Manejo biológico .....	40
3.4.4.3 Manejo químico.....	40
	10

4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
4.1	Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal para el mantenimiento de las cochinillas.....	42
4.1.1	Diseño experimental y su análisis estadístico .....	44
4.2	Evaluación de la eficiencia de diversos agentes dispersantes .....	44
4.2.1	Evaluación de la capacidad de los dispersantes para humectar al insecto....	44
4.2.2	Efecto directo de los dispersantes sobre la cochinilla. ....	46
4.2.2.1	Diseño experimental y análisis estadístico .....	46
4.2.3	Compatibilidad del dispersante con los hongos entomopatógenos.....	46
4.2.3.1	Diseño experimental y su análisis estadístico.....	47
4.3	Efecto de los propágulos y los filtrados metabólicos de hongos entomopatógenos sobre <i>Pseudococcus elisae</i> , bajo condiciones de laboratorio. ....	47
4.3.1	Origen de los hongos entomopatógenos utilizados .....	48
4.3.2	Producción de propágulos y metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos, utilizando dos agentes inductores de enzimas líticas. ....	49
4.3.3	Tratamientos aplicados .....	54
4.3.4	Diseño experimental .....	57
4.3.5	VARIABLES MEDIDAS.....	58
4.3.6	Análisis estadístico.....	58
5.	RESULTADOS .....	59
5.1	Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal, para el mantenimiento de las cochinillas.....	59
5.2	Eficacia de los agentes dispersantes .....	61
5.2.1	Efecto de los dispersantes sobre la mortalidad de las cochinillas harinosas	61
5.2.2	Compatibilidad de Break thru® con los hongos entomopatógenos. ....	64

5.3	Mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos metabólicos de los hongos entomopatógenos. ....	65
5.3.1	Resultados individuales para cada bioensayo. ....	65
5.3.2	Comparación grupal según aislamiento y tratamiento. ....	75
6.	DISCUSIÓN.....	77
6.1	Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal, para el mantenimiento de las cochinillas.....	77
6.2	Eficacia de diferentes agentes dispersantes y su compatibilidad con los hongos entomopatógenos .....	79
6.3	Mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados metabólicos de los hongos entomopatógenos.....	81
7.	CONCLUSIONES.....	85
8.	RECOMENDACIONES.....	87
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	88
	ANEXOS.....	103

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales insectos plagas en el cultivo de banano. ....	24
Cuadro 2. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos. ....	32
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>P. elisae</i> . ....	37
Cuadro 4. Agentes dispersantes y sus concentraciones evaluadas, como humectantes de la cutícula de la cochinilla harinosa, <i>Pseudococcus elisae</i> . ....	45
Cuadro 5. Hongos entomopatógenos empleados en la prueba de patogenicidad (suspensión conidial) y de eficacia de metabolitos secundarios. ....	48
Cuadro 6. Composición del medio inductor Saboraud Liquid Medium. ....	49
Cuadro 7. Composición del medio inductor enriquecido con quitina*. ....	49
Cuadro 8. Composición del medio inductor con adición de cutícula. ....	50
Cuadro 9. Tratamientos utilizados para la evaluación de propágulos y metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos. ....	54
Cuadro 10. Distribución de los aislamientos de hongos entomopatógenos según bioensayos. ....	56
Cuadro 11. Porcentaje de mortalidad de las cochinillas, de acuerdo al sustrato vegetal de alimentación. ....	59
Cuadro 12. Eficacia de los dispersantes para penetrar las capas serosas y humectar a la cochinilla a diferentes concentraciones de producto comercial. ....	61
Cuadro 13. Efecto de los dispersantes Cosmo-IN d® y Break thru® sobre la mortalidad de las cochinillas. ....	63
Cuadro 14. Porcentaje de viabilidad de conidios de cuatro aislamientos de hongos entomopatógenos, tratados con Break thru®, en condiciones in vitro. ....	64
Cuadro 15. Bioensayo N°1; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>B. bassiana</i> (ENTO-01), <i>M. anisopliae</i> (ENTO-29) y <i>P. lilacinum</i> (PI-11). ....	66

Cuadro 16. Bioensayo N°2; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>B. bassiana</i> (ENTO-05), <i>M. anisopliae</i> (ENTO-23) y <i>P. lilacinum</i> (PI-10). .....	67
Cuadro 17. Bioensayo N°3; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>B. bassiana</i> (ENTO-03), <i>L. lecanii</i> (LL-56) y <i>M. anisopliae</i> (MA-15). .....	69
Cuadro 18. Bioensayo N°4; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>M. anisopliae</i> (ENTO-24 y ENTO-25). .....	71
Cuadro 19. Bioensayo N°5; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>B. bassiana</i> (ENTO-12), <i>M. anisopliae</i> .....	72
(ENTO-34 y ENTO-36). .....	72
Cuadro 20. Bioensayo N°6; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> (ENTO-33) y <i>P. lilacinum</i> (PI-12). .....	73
Cuadro 21. Mortalidad promedio de <i>P. elisae</i> según medio inductor. Datos según bioensayo.....	74
Cuadro 22. Medias de mortalidad de cochinillas, tratadas con 16 aislamientos de hongos entomopatógenos (la mortalidad promedio del testigo fue de 5%). .....	75
Cuadro 23. Medias de mortalidad de <i>P. elisae</i> , según tipo de tratamiento (propágulos y filtrados) .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales países exportadores de banano a nivel mundial (Toneladas). (Fuente: Muñoz, 2014).....	22
Figura 2. A. Insectario de <i>P. elisae</i> , ubicado en CORBANA. B. Frutos de <i>Cucurbita moschata</i> colonizados por <i>P. elisae</i> .....	42
Figura 3. Ubicación de las unidades experimentales para la prueba de selección del sustrato. 43	
Figura 4. Inoculación de los medios inductores... ..	50
Figura 5. Esquematización del sistema de determinación de la pureza de los medios inductores líquidos.....	51
Figura 6. Inoculación de bolsas con arroz y granza, y su incubación para la producción de conidios.....	52
Figura 7. Esquematización del proceso para la producción de propágulos y metabolitos .....	53
Figura 8. Aplicación de los tratamientos de un determinado bioensayo.....	55
Figura 9. Recipiente plástico donde se ubicó el sustrato.....	57
Figura 10. Acondicionamiento de las unidades experimentales.....	57
Figura 11. Frutos de chayote colonizados por cochinillas.....	60
Figura 12. Escaso desarrollo de ovisacos de la cochinilla harinosa del banano, en frutos de tacacos y tubérculos de camote. ....	60
Figura 13. Eficacia de Break thru® (0,06%) como agente humectante sobre la cutícula de la cochinilla.....	62
Figura 14. Efecto de los dispersantes Cosmo-IN d® y Break thru® sobre la mortalidad de las cochinillas.....	63
Figura 15. Conidios germinados de <i>B. bassiana</i> (ENTO-01), <i>M. anisopliae</i> (ENTO-29), <i>L. lecanii</i> (LL-56) y <i>P. lilacinum</i> (PL-11), expuestos a Break thru®.....	64
Figura 16. A) <i>Pseudococcus elisae</i> momificado por <i>Beauveria bassiana</i> (ENTO-05); B) detalle de conidióforo de <i>B. bassiana</i> presente sobre la cutícula del insecto (40X). ....	68

Figura 17. Cochinillas tratadas con metabolitos de naturaleza proteolítica y quitinolítica del aislamiento LL-56. ....	70
Figura 18. Insecto colonizado (micelio) por <i>M. anisopliae</i> , producto de la aplicación del tratamiento ENTO-24-PQ. ....	71
Figura 19. Liofilización de la cutícula y su presentación final.....	103

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo utilizado para procesar la cutícula de <i>Galleria mellonella</i> . ....	103
Anexo 2. Prueba para determinar la pureza y viabilidad de los conidios. ....	104
Anexo 3. Metodología utilizada para la evaluación de la concentración de conidios. ...	105
Anexo 4. Metodología planteada para evaluar el efecto de propágulos y metabolitos secundarios de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, sobre la cochinilla harinosa <i>Pseudococcus elisae</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	106



## 1. INTRODUCCIÓN

La producción del banano es una actividad que se ha desarrollado a nivel mundial, principalmente en América Latina, el Caribe, Asia y África. La región de América Latina y el Caribe produce el 90% del banano que se comercializa en el mundo, requiriendo para ello el uso de alta tecnología, insumos agrícolas como fertilizantes, insecticidas, nematocidas, herbicidas y fungicidas. El banano se ha posicionado como el cuarto alimento más importante del mundo después del arroz, el trigo y la leche; es una valiosa fuente de ingresos para la economía familiar, mejorando el nivel de vida de los trabajadores bananeros (FAO 2004).

En Costa Rica la producción y exportación del banano se inició hace más de 100 años, concentrándose en un 98% en la zona del Caribe, y estimándose para el año 2015, un área total de 43,024 hectáreas de cultivo, y representando un aumento del 0,3% con respecto al año 2014 (42,916 ha). Además, esta actividad generó para el año 2015 aproximadamente US\$833,4 millones de divisas, producto de la exportación de 1.825.498 toneladas métricas de fruta. En este mismo año los principales mercados a donde se exportó el banano fueron la Unión Europea (Reino Unido, Bélgica, Italia, Alemania, Grecia, España y Suecia), con el 55,2% de la fruta nacional, y los Estados Unidos, con el 36%. Otros mercados recibieron en total 8,8% de la fruta costarricense, destacando Panamá, Arabia Saudita y Rusia, así como países europeos no incorporados a la Unión Europea (especialmente Turquía y Noruega) (CORBANA 2016).

En el ámbito fitosanitario, las principales enfermedades que afectan el cultivo del banano son: Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), marchitez bacteriana o Moko (*Ralstonia solanacearum*), podredumbre bacteriana (*Erwinia musae*), antracnosis del banano (*Colletotrichum musae*), podredumbre de la corona (*Gloeosporium musarum*) (Orlando y Flores 2003), en América se ha considerado el mal de Panamá raza tropical 4 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder and Hansen) como amenaza, debido a que ha afectado los cultivos de Cavendish en Sudáfrica, Australia y Asia (FAO 2004). También, lo afectan el virus del bunchy top (BTV), virus del mosaico de la bráctea (BBrMV), virus del estriado del plátano (BSV) y virus del mosaico del plátano (BMV). A nivel de sistema radicular y cormo, el cultivo se ve afectado por el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), y por diferentes especies de nematodos, como el nematodo barrenador (*Radophulus similis* Cobb), nematodo agallador (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica*) y el

nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) (Orlando y Flores 2003; Manzo *et al.* 2014). También existen insectos que afectan la parte aérea de la planta, los cuales se hacen notar desde las etapas tempranas de desarrollo, en la etapa de crecimiento del pseudotallo, y en la etapa productiva. A nivel de racimo, los insectos pueden ingresar incluso desde la cuarta semana, tal como se ha observado con áfidos, cochinillas harinosas, escamas y trips de la mancha roja (Portal frutícola 2013).

Las cochinillas, como *Pseudococcus elisae*, son insectos chupadores ampliamente reconocidos como plaga de importancia económica en muchos cultivos alrededor del mundo (Williams y Granara 1992; Suárez 1999). Según Cubillo (2013), en el cultivo del banano (*Musa* AAA), las cochinillas se encuentran dentro del complejo de plagas de mayor importancia económica, transformándose en algunas ocasiones en una de las limitantes del sector bananero, al ser un insecto de carácter cuarentenario en los diferentes destinos a los cuales se exporta la fruta, su detección en un embarque, es motivo suficiente para su total destrucción (Coto y Saunders 2004; Cubillo y Laprade 2005 y Guillén *et al.* 2010). También el género *Pseudococcus* sp. se ha asociado a la transmisión del virus del estriado del plátano (BSV) (Manzo *et al.* 2014). Además, estos insectos generan pérdidas cuantiosas, las cuales pueden ser por efecto directo o indirecto del insecto.

El control de la plaga ha sido enfocado hacia la prevención, implementando prácticas culturales como el “desburille” (retirar capas del pseudotallo en donde se refugian y reproducen las cochinillas) y el “aseo” (control de malezas en el área de la base de la planta de banano) y haciendo uso de insecticidas químicos (CORBANA 2009). Según Castro *et al.* (2010) y Cubillo (2013), dentro de las opciones de control biológico del insecto, se han identificado tantos depredadores de los géneros *Pentilia*, *Crysoperla* y *Cryptolaemus*, así como algunos parasitoides del género *Anagyrus*.

Por otro lado, existen pocos reportes sobre el potencial de hongos entomopatógenos como controladores sobre *P. elisae*, sin embargo, existe la posibilidad de que géneros como *Aschersonia*, *Cordyceps*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium*, así como otros más afines a hemípteros como *Metarhizium*, *Entomophthora* e *Isaria*, puedan ser útiles en el control, si se les selecciona y utilizan adecuadamente. Como menciona Bastidas *et al.* (2009), factores ambientales como la alta radiación solar y temperatura, hacen necesario el empleo de agentes coadyuvantes que aporten niveles de protección a los propágulos infectivos.

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea desarrollar una metodología para evaluar el efecto individual de los propágulos y metabolitos secundarios de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos nativos de la región bananera Huetar Atlántica, sobre la cochinilla harinosa del banano (*Pseudococcus elisae*), bajo condiciones de laboratorio. Se espera con esto, seleccionar un sustrato que permita el adecuado mantenimiento de *P. elisae* a lo largo de los bioensayos; evaluar el posible efecto de diferentes productos dispersantes, sobre el insecto y la viabilidad de los hongos entomopatógenos; y finalmente, seleccionar agentes de control biológico promisorios para regular las poblaciones del insecto, brindando así nuevas alternativas al uso de productos químicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Desarrollar una metodología para evaluar el efecto de propágulos y metabolitos secundarios de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, sobre la cochinilla harinosa *Pseudococcus elisae*, bajo condiciones de laboratorio.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la eficacia de diferentes sustratos de naturaleza vegetal, para el mantenimiento de las cochinillas.
2. Evaluar la eficacia de diferentes agentes dispersantes de origen natural y sintético, para mejorar la aplicación de los tratamientos.
3. Analizar la mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados metabólicos crudos de naturaleza quitinolítica y proteolítica, de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. lilacinum*, *L. lecanii*).

### **3. REVISIÓN DE LITERATURA**

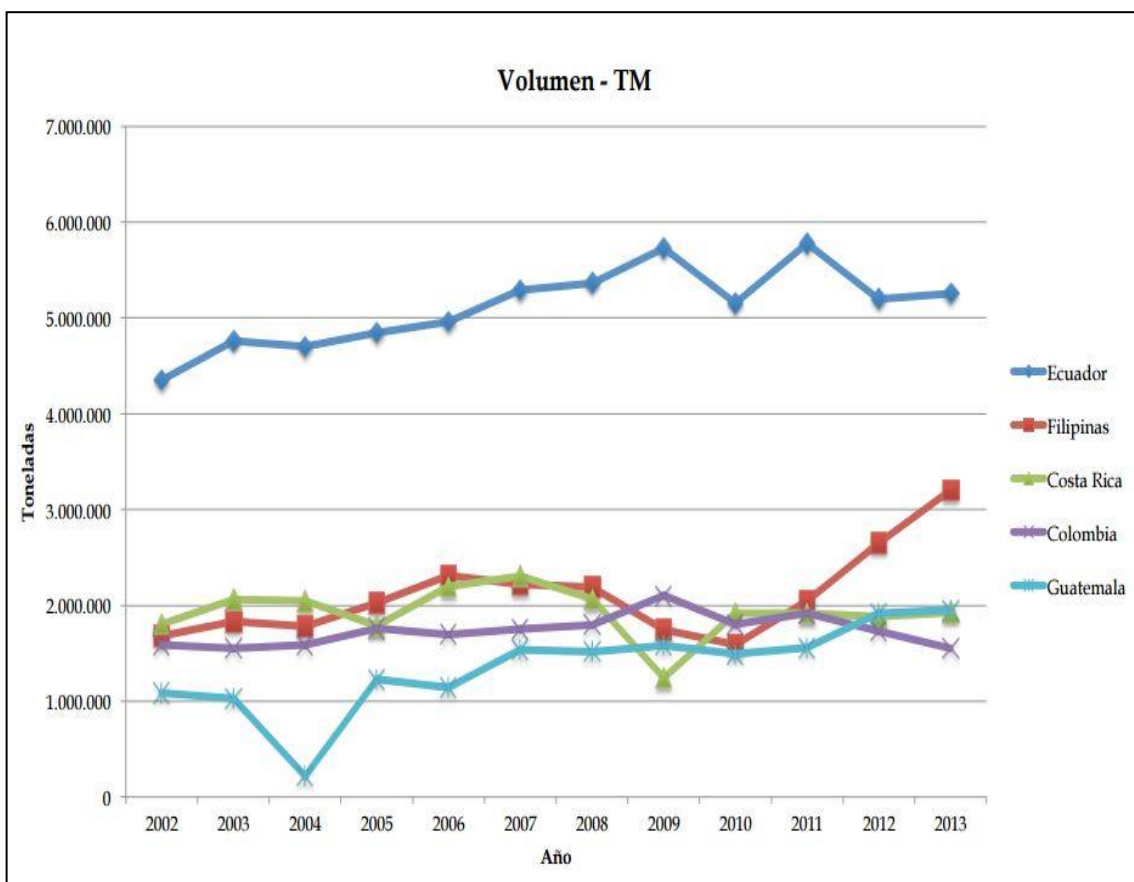
#### **3.1 Generalidades del cultivo del banano**

El lugar de origen de los bananos, los plátanos y otros tipos de musáceas (*Musa* AA, AB, AAA, AAB) es el sureste asiático. Todas las musáceas existentes en África y en América, tienen por lo tanto su centro de diversidad genética en la Costa Pacífica de Asia. Algunos cultivares de *Musa* de África Occidental, originarios posiblemente de Nueva Guinea, se introdujeron a islas Canarias y luego, en el año 1516, se llevaron a América. No obstante, evidencias antropológicas sugieren que ya existían musáceas en el Continente Americano antes de la llegada de Cristóbal Colón en el año 1502 (Sandoval 2009).

El cultivo del banano se da tanto en áreas tropicales como subtropicales y mediterráneas, bajo diferentes sistemas intensivos o extensivos, donde de manera general los rendimientos van desde 7 hasta 70 ton/ha por año (Castrillón 2003). Según Arias *et al.* (2004), a nivel mundial, durante los años 1985-2002, la industria bananera fue una de las actividades agrícolas de mayor importancia como fuente de ingreso, tanto a nivel local como internacional; siendo el banano el principal producto agrícola de exportación, seguido por la piña y el café.

#### **3.2 Cultivo del banano en Costa Rica**

El cultivo del banano representa a nivel mundial el 12% de las exportaciones totales de frutas (Valerio *et al.* 2002). Para el año 2013, Costa Rica se ubicó en el tercer lugar dentro de los principales exportadores de banano a nivel mundial (Figura 1) (Muñoz 2014). La producción nacional se concentra en plantaciones relativamente extensas de banano tipo Cavendish, el cuál sustituyó al Gros Michel (debido a su resistencia a la enfermedad de Panamá y a su mayor productividad). Plantaciones con altos rendimientos por hectárea cosechada, donde se registraron para el año 2015 rendimientos de aproximadamente 42,4 toneladas/ha (2,339 cajas/ha). Presentando uno de los más altos niveles de productividad bananera del mundo por su alto grado de tecnificación e investigación en materia bananera (CORBANA 2016).



**Figura 1. Principales países exportadores de banano a nivel mundial (Toneladas). (Fuente: Muñoz, 2014).**

En el año 2015 Costa Rica exportó 101 millones de cajas de banano con un peso de 18,14 kilos cada una, es decir, alrededor de 1,825,498 toneladas métricas. Para este mismo año el área bananera de Costa Rica alcanzó las 43,024 hectáreas en producción, registrando un aumento del 0,3% con respecto al área en el 2014 (CORBANA 2016).

La agroindustria bananera en nuestro país se ha desarrollado como una importante cadena agroexportadora, generando grandes oportunidades laborales para los habitantes de las zonas circundantes a las plantaciones (Villalobos 2011). En Costa Rica en promedio se utiliza casi un trabajador directo por hectárea de plantación, este es uno de los índices de ocupación laboral más altos de toda la industria agrícola. Durante el 2015, los empleos directos generados por la industria bananera ascendieron aproximadamente a 40,000. Además, el sector genera cerca de 100.000 plazas de manera indirecta en actividades conexas, tales como comercio, fábricas de insumos y transporte (CORBANA, 2016).

Alrededor del mundo hay más de 180 especies de insectos plaga que afectan el cultivo de banano (*Musa AAA*), que dependiendo de las condiciones ambientales, pueden causar importantes perjuicios en la producción. En Costa Rica antes de 1950, existían dos plagas importantes en el cultivo del banano: el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y el trips de la mancha roja (*Chaetanaphothrips orchidii* y *C. signipennis*). Actualmente la plaga de mayor importancia económica en el cultivo de banano a nivel nacional es el picudo negro (*C. sordidus*) (Amador *et al* 2015). Sin embargo, para el 2013 se registra una lista de las principales plagas del cultivo del banano, las cuales se detallan en el Cuadro 1; tales plagas afectan diferentes partes de la planta, desde el cormo, pseudotallo, hojas, flores y frutos (Cubillo, 2013).

**Cuadro 1. Principales insectos plagas en el cultivo de banano.**

<b>PLAGA</b>	<b>NOMBRE CIENTÍFICO</b>	<b>ORGANO QUE AFECTA</b>
<b>Picudo negro</b>	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Cormo
<b>Picudo rayado</b>	<i>Metamasius hemipterus sericeus</i>	Cormo
<b>Taladrador</b>	<i>Castniomera humboldti</i>	Pseudotallo
<b>Colaspis</b>	<i>Colaspis</i> spp., <i>Allocolaspis</i> spp.	Hojas y frutos
<b>Cochinillas harinosas</b>	<i>Pseudococcus elisae</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>Dismicoccus brevipes</i> , <i>Ferrisia virgata</i> , <i>Nipaecoccus nipae</i>	Frutos
<b>Escamas</b>	<i>Diaspis boisduvalii</i> , <i>Aspidiotus destructor</i> , <i>Chrysomphalus aonidium</i>	Frutos
<b>Áfidos</b>	<i>Pentalonia nigronervosa</i> , <i>Aphis gossypii</i>	Frutos
<b>Trips de la mancha roja</b>	<i>Chaetanaphothrips orchidii</i> , <i>C. signipennis</i>	Frutos
<b>Trips de la flor</b>	<i>Frankliniella párvula</i>	Frutos
<b>Gusano basurero</b>	<i>Anatrachyntis rileyi</i>	Flores y frutos
<b>Mosca chichera</b>	<i>Hermetia illucens</i>	Frutos
<b>Abeja conga</b>	<i>Trigona corvina</i>	Frutos
<b>Abeja costurera</b>	<i>Orasema costaricensis</i>	Frutos
<b>Hormigas locas</b>	<i>Paratreachina longicornis</i>	Frutos
<b>Gusano caterpillar</b>	<i>Hypercompe icasia</i> , <i>Platynota rostrana</i>	Frutos
<b>Ceramidia</b>	<i>Antichloris viridis</i>	Hojas
<b>Caligo</b>	<i>Caligo memmon</i>	Hojas
<b>Gusano verde</b>	<i>Opsiphanes tamarindi</i>	Hojas
<b>Gusano canasta</b>	<i>Oiketicus kirbyi</i>	Hojas
<b>Gusano monturita</b>	<i>Acharia apicalis</i>	Hojas
<b>Gusano cogollero</b>	<i>Spodoptera</i> spp.	Hojas
<b>Mosca blanca</b>	<i>Aleurodicus dispersus</i> , <i>Aleurodicus floccosus</i> , <i>Aleurodicus talamancensis</i>	Hojas
<b>Chinche hedionda</b>	<i>Scaptocoris divergens</i>	Raíces

Fuente: Cubillo (2013).



### **3.3 Control biológico**

El Control Biológico se define como “el uso de organismos para reducir el inóculo o la actividad de un patógeno” (Nicholls 2008). De este concepto se deriva el de control biológico aplicado, el cual se refiere a la introducción de los enemigos naturales por el ser humano y el manejo que éste hace de ellos para controlar las plagas (Nicholls 2008). En los últimos años el concepto se ha extendido a la utilización de productos naturales como productos de fermentación controlada de cultivos de bacterias u hongos (p. ej., metabolitos secundarios y proteínas de bajo peso molecular), téis orgánicos (p. ej., compostajes, lixiviados de lombricompost) y extractos de plantas con algún efecto biocida. Estas alternativas pueden desempeñar un papel importante en la protección de cultivos, si se utilizan bajo el concepto de Manejo Integrado de Plagas (Carr 2009).

En el control biológico los enemigos naturales (agentes) constituyen el recurso fundamental del cual depende su éxito. Los agentes provienen de una gran variedad de grupos taxonómicos, así como de poblaciones con propiedades biológicas y diversas. Estos enemigos naturales pueden ser: a) Depredadores, que son artrópodos (insectos y arácnidos); b) Parasitoides, los cuales se desarrollan fuera o dentro del insecto plaga, son parásitos en sus estados inmaduros, siempre matan a sus hospedantes (plaga), aunque éstos pueden completar la mayoría de su ciclo de vida antes de morir; y c) Patógenos, que son microorganismos parásitos (virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoos, principalmente), que producen enfermedades en sus hospedantes (Nicholls 2008).

Es importante mencionar como el uso de agentes de control biológico de plagas adquiere relevancia como una opción en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el medio ambiente para futuras generaciones; su aplicación controlada en agroecosistemas, implica un mejor rendimiento de los cultivos, ya que los microorganismos que actúan como controladores biológicos pueden mantener las poblaciones de insectos perjudiciales en niveles que no ocasionan daños económicos importantes (Villalobos 2012).

#### **3.3.1 Hongos entomopatógenos**

Los hongos son microorganismos eucariontes, sin clorofila; pueden ser unicelulares o pluricelulares; son filamentosos y con paredes celulares que contienen quitina y celulosa.

Se reproducen sexual o asexualmente con o sin esporas; la reproducción asexual es la más frecuente, involucrando la formación de esporas microscópicas de paredes delgadas llamadas conidios, los cuales se desarrollan en los conidióforos (Villalobos 2012). Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos.

Según Téllez *et al.* (2009) existen alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos en casi 100 géneros aproximadamente. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Varias de estas especies han sido evaluadas para el control de insectos y existen en el mercado como bioinsecticidas de fácil aplicación, rentables y ambientalmente inocuos.

De acuerdo a Alean *et al.* 2004 los hongos entomopatógenos son considerados como los agentes de control biológico más promisorios contra insectos chupadores, como es el caso de los áfidos, escamas, moscas blancas y cicadélidos, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula; sus múltiples mecanismos de acción les confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia.

La mayoría de los hongos entomopatógenos presentan crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos, sin embargo, algunas especies no producen crecimiento superficial o producen muy poco. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, en particular, alta humedad relativa (óptima para germinación, por encima de 95%) y temperatura (entre 20 y 30°C) adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Falconi 2009).

### **3.3.1.1 Proceso de infección de los hongos entomopatógenos**

Los hongos pueden infectar insectos a través del intestino, espiráculos y particularmente a través del integumento, lo que lleva directamente a considerar la posibilidad teórica de infectar insectos independientes de su actividad alimenticia (Uribe 2003).

A continuación, se detalla el proceso de infección de los hongos entomopatógenos:

- A. Adherencia del conidio a la cutícula del insecto:** El primer contacto que hace el conidio con la superficie del hospedero es por la cutícula. Las características físicas y químicas de la superficie de la cutícula del insecto y el conidio son las responsables de esta unión. Esta interacción depende de las sustancias mucilaginosas que rodean el conidio, de las enzimas que harán posible la penetración del hongo dentro del insecto y de las características morfológicas del tegumento. En algunos hongos la adhesión es un fenómeno no específico, mientras que en otros esto es un proceso específico. Algunas glicoproteínas pueden servir como receptores específicos para la adhesión por parte de los conidios (Tanada y Kaya 1993, Farguez 1984; citados por Pariona 2006).
- B. Germinación del conidio:** Luego de la adhesión e hidratación del conidio sobre el tegumento, este germina emitiendo un tubo germinativo con formación, en algunos casos de un apresorio, para posteriormente penetrar el insecto (Lecuona 1996). La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación (Arana 2011). La germinación del conidio se inicia con el agrandamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto. La hidratación del conidio es favorecido por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. *Metarhizium anisopliae* presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto. Sin embargo, se han encontrado esterases y proteasas en conidios no germinados, lo que sugiere una modificación de la superficie cuticular previa a la germinación, ya que durante la hidratación el conidio no solo absorbe agua, sino también nutrientes (Pucheta *et al.* 2006).
- C. Penetración de la cutícula:** El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula. El apresorio sirve para el anclaje del conidio y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas,

lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (Monzón 2001, citado por Pucheta *et al.* 2006).

- D. Multiplicación en el hemocele:** Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos pasan del crecimiento micelial a fase levaduriforme (crecimiento por gemación) (Pariona 2006). Esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación (Arana 2011).
- E. Producción de toxinas:** Ya en el interior del insecto, los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune, para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular. Un tema muy común en la literatura de patología de insectos, es la producción de toxinas por diversas especies de hongos entomopatógenos. Existe un considerable número de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos, muchos de los cuales han demostrado poseer actividad insecticida (Téllez *et al.* 2009).
- F. Muerte del insecto:** 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 y deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Téllez *et al.* 2009).
- G. Desarrollo de la fase micelial:** En esta fase aparecen pequeñas manchas melanizadas en los sitios de infección. Observándose en algunos casos una coloración rojiza en el insecto hospedero. Estos insectos sirven de reservorio para los hongos durante periodos de condiciones adversas (Pucheta *et al.* 2006). Esto ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación, tales condiciones varían algunas veces por la especie del microorganismo, en el caso de *M. anisopliae*, su ciclo se completa entre 7 y 10 días (Arana 2011).
- H. Producción y dispersión de conidios:** Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde esporula, esto también puede ocurrir en insectos vivos. Finalmente, la dispersión del conidio puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características del conidio y conidioforo. Cada

conidio puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Téllez *et al.* 2009).

### 3.3.1.2 Algunos hongos entomopatógenos utilizados en el control biológico

#### A) *Beauveria bassiana*:

El hongo *Beauveria bassiana* se clasifica taxonómicamente en el reino Fungi, filum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae, género *Beauveria* y especie *B. bassiana* (International Mycological Association (IMA) 2016). Se mantienen datos desde 1834, cuando se logró demostrar que este producía la muerte del gusano de seda, *Bombix mori*; y que es uno de los más estudiados a nivel universal, tanto por sus aspectos básicos, como aplicados. La distribución de este hongo es mundial, se encuentra parasitando insectos desde el nivel del mar hasta los 3000 de altitud y se puede encontrar tanto en la materia orgánica en descomposición, como en hospederos parasitados. Se reporta que este hongo ataca a más de 200 especies de insectos de distintos órdenes (Ugalde 2010).

Este hongo presenta un aspecto algodonoso y tiene una coloración blanca que en ocasiones torna a crema o amarillo anaranjado; presenta fiálidas cortas y globosas en la base y estrechas en su parte superior, agrupadas normalmente en verticilos. Cada una de estas fiálidas porta un conidio en forma de balón (Herrero 2011).

#### B) *Metarhizium anisopliae*:

Es un hongo imperfecto que pertenece al reino Fungi, filum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae, género *Metarhizium* y especie *M. anisopliae* (IMA 2016). Se caracteriza por la formación de micelio septado con producción de conidios de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro, o formas de reproducción asexual, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas. Este hongo se encuentra en la naturaleza en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc.; logra un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. *M. anisopliae* ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. El ciclo biológico del *M. anisopliae* comprende dos fases: una patogénica y otra saprofítica. La fase de

patogénesis ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo del hospedante; y en la saprofítica el hongo completa su ciclo aprovechando los nutrientes del cadáver del insecto. Tal hongo es un parásito facultativo, el cual posee conidios que constituyen las unidades infectivas del hongo (García *et al.* 2011).

### **C) *Purpureocillium lilacinum*:**

Este hongo pertenece al reino Fungi, filum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Ophiocordycipitaceae, género *Purpureocillium* y especie *P. lilacinum* (IMA 2016). Los conidióforos de género *Purpureocillium* son ramificados, los conidios se encuentran agrupados en forma de cadena, presenta un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos de ramificaciones laterales, con una coloración lila; el crecimiento óptimo para el desarrollo del microorganismo ocurre en un rango de 26-30°C con un pH de 2-10 (Acosta 2006).

*Purpureocillium lilacinum* (Thom.) es un hongo filamentoso habitante del suelo que ha sido reportado reduciendo la densidad poblacional de nematodos parásitos de plantas y animales, y es considerado como uno de los agentes de biocontrol más promisorios para el manejo de huevos de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* spp. (Ardilo 2013). Sin embargo, Jiménez (1992) hace referencia que a pesar de presentar *P. lilacinum* alta especificidad en el control de nematodos, se ha encontrado parasitando insectos del orden hemíptera y lepidóptera (Jiménez 1992).

### **D) *Lecanicillium lecanii*:**

Este hongo pertenece al reino Fungi, filum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae, género *Lecanicillium* y especie *L. lecanii* (IMA 2016). Es un hongo imperfecto que se reproduce asexualmente por conidios, los cuales son pequeños, hialinos, cilíndricos o elipsoidales y redondeados, con medidas que varían de 2.3 a 10 milimicras de largo por 1-2.5 milimicras de ancho; estos conidios se encuentran insertados en los extremos de los conidioforos, con fiálides colocadas de manera verticilar (Silva 2005). Las condiciones favorables para el hongo son alta humedad (por encima del 85%) y temperaturas entre los 20 a 25°C (Batista 1998).

Es un hongo de amplia distribución que puede ocasionar epizootias de gran magnitud en regiones de clima tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos. *Lecanicillium lecanii* posee un amplio rango de hospederos atacando insectos de los órdenes Homoptera, Coleoptera, Diptera y Collembola entre otros (Silva 2005). En países como Inglaterra y Suiza, se originaron formulaciones comerciales de *L. lecanii* (Vertalec, Mycotal, Thriptal) empleadas para el control de pulgones, mosca blanca y thrips (Lecuona 1996). En Brasil, identificaron que *L. lecanii* causa parasitismo en poblaciones de cochinillas de cítricos y principalmente sobre *Coccus viridis* en café, manteniendo las poblaciones de esas plagas en niveles donde no provocan daños económicos (Batista 1998).

### **3.3.1.3 Principales metabolitos involucrados en el proceso de infección de hongos entomopatógenos**

Se ha identificado la capacidad de los hongos entomopatógenos de producir un número elevado de metabolitos secundarios, algunos pueden ser de estructura orgánica simple, pero con frecuencia son compuestos de estructura un poco más compleja, muchos de ellos son toxinas peptídicas cíclicas y lineales (Cuadro 2) (Borges *et al.* 2010).

**Cuadro 2. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos.**

CLASIFICACIÓN	HONGOS QUE LAS PRODUCEN
<b>No peptídicas</b> <b>Oospereína</b> <b>Tenellina</b> <b>Bassianina</b> <b>Ácido oxálico</b> <b>Ácido dipicolínico</b> <b>Paecilomicinas</b>	<i>Beauveria tenella, B. bassiana</i> <i>B. tenella</i> <i>B. bassiana</i> <i>Beauveria, Metarhizium, Verticillium</i> <i>Beuveria, Paecilomyces,</i> <i>Verticillium</i> <i>Paecilomyces tenuipes</i>
<b>Peptídicas lineales</b> <b>Leucinostinas</b> <b>Efraeptinas</b>	<i>Paecilomyces</i> <i>Tolypocladium</i>
<b>Peptídicas cíclicas</b> <b>Beuvericina</b> <b>Beauverólidos</b> <b>Destruxinas</b> <b>Eniatinas</b> <b>Ciclosporinas</b>	<i>B. bassiana, Paecilomyces</i> <i>B. bassiana, Paecilomyces</i> <i>Metarhizium</i> <i>Fusarium</i> <i>Metarhizium</i>

Fuente: Assaf (2006).

Los metabolitos secundarios son parte de los compuestos más importantes que los organismos producen principalmente en la fase estacionaria de crecimiento, como por ejemplo algunos antibióticos y enzimas. Estos están ligados fuertemente a las condiciones de cultivo y algunos de ellos han tenido gran importancia a nivel industrial (Madigan *et al.* 1991, citado por Castellanos 2012). Los metabolitos de carácter insecticida producidos por estos hongos tienen varios modos de acción y en muchos casos suelen ser la causa directa de la muerte del insecto, actuando sobre las células especializadas del sistema inmune para evitar su ataque a las estructuras invasivas de los hongos (Téllez *et al.* 2009).



Muchos de los metabolitos fúngicos utilizados como agentes de biocontrol de microorganismos fitopatógenos, presentan diferentes modos de acción específicos o no específicos, y comprenden tanto agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas, siendo considerados como mecanismos de antibiosis y agrupados dentro de estos fenómenos de antagonismo como antibióticos, sustancias volátiles y enzimas (Castellanos 2012).

Esto abre la posibilidad de utilizar estos hongos para otras aplicaciones tales como un proceso integrado biotecnológico para la transformación de residuos de cáscara de camarón y cutícula de los insectos en productos de alto valor (como quitosano en la industria farmacéutica), que son la base para la producción de productos biológicos utilizados como fungicidas (Mayorga *et al.* 2012).

Dentro de los metabolitos secundarios se han reportado toxinas peptídicas cíclicas y lineales; las primeras pertenecen a una familia de péptidos conocidos como depsipéptidos. El primer compuesto de esta naturaleza en haber sido caracterizado fue la beauvericina, extraída del micelio de *Beauveria bassiana*, y posteriormente se han aislado de diferentes especies de *Fusarium* y *Purpureocillium*. La acción insecticida de estos depsipéptidos es específica para ciertos grupos de insectos y su toxicidad se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos, entre los que se incluye la beauvericina (Pucheta *et al.* 2006, Borges *et al.* 2010).

Se ha identificado la capacidad de *M. anisopliae* de producir gran variedad de metabolitos secundarios; donde los compuestos tóxicos más estudiados y caracterizados, han sido las destruxinas, ya que su modo de acción inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos. Estos ciclodepsipéptidos son producidos durante el crecimiento micelial y hasta el momento se han identificado más de 14, de los cuales los más importantes son destruxina A, B, C, D, E y desmetildestruxina (Pucheta *et al.* 2006, Borges *et al.* 2010, García *et al.* 2011). Las destruxinas A, B y E, mostraron propiedades insecticidas al ser probadas en larvas de *Plutella xylostella*, así como en larvas y adultos de *Phaedon cochleariae*, con un nivel de mortalidad alto en las poblaciones de insectos; también, causaron deformaciones en los élitros y alas anteriores del insecto (Pucheta *et al.* 2006). Asimismo, se evidenció que las destruxinas son capaces de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de Malpighi en *Schistocerca gregaria* (Borges *et al.* 2010).

Las quitinasas y proteasas, son enzimas que excretan los hongos para degradar sustratos poliméricos como la quitina (Zibae et al. 2009, Franko et al. 2011). Las quitinasas se encuentran estrechamente reguladas por sus productos de degradación, por lo que son sólo requeridas por períodos cortos durante la penetración de las hifas a la cutícula del hospedante. Las proteasas son producidas como parte del mecanismo de patogénesis, liberando la quitina de la cutícula de los insectos y facilitando su hidrólisis. Se ha reportado la estrecha relación que existe entre la actividad quitinolítica y proteolítica, por ello, las quitinasas y las proteasas, están reguladas por factores como el tipo de sustrato (Rocha 2009).

Las proteasas más comunes en hongos entomopatógenos son las serina-proteasas del tipo subtilisina (Pr1) y tripsina (Pr2), ambas son enzimas extracelulares secretadas eficientemente para la degradación de la cutícula, proporcionando nutrientes para el crecimiento del hongo (Zibae et al. 2009, Franko et al. 2011). La proteasa Pr1 es considerada un importante factor de virulencia en *Metarhizium anisopliae*. De la misma forma, la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa de *Beauveria bassiana*, acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23%. De esta manera, se demuestra la importancia de la secreción de estas enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos, lo cual pudiera ser una herramienta para la selección de mejores aislamientos para la formulación de insecticidas biológicos (Téllez et al. 2009).

Una estrategia que se ha sugerido, ha sido la modificación genética de *Metarhizium anisopliae* para sobre expresar la proteasa PR1; otra estrategia es hacer crecer a los hongos utilizando inductores que permitan una eficiente producción de estas enzimas en cultivos líquidos o sólidos y que permiten mantener la virulencia de los hongos entomopatógenos. Sin embargo, las quitinasas que actúan sinérgicamente con las proteasas, son las enzimas que están involucradas directamente con la degradación de la cutícula de los insectos plaga, además de estar implicados en la etapa de germinación, crecimiento hifal, nutrición y defensa contra competidores (Franko et al. 2011).

Por otro lado, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria* spp., *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae*, compuesto que ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los hongos entomopatógenos, puede ser un elemento que coadyuve a solubilizar la proteína cuticular. Otro compuesto importante producido por algunos hongos entomopatógenos

(como *Paecilomyces* spp. y *M. anisopliae*), es el ácido 2,6-piridindicarboxílico (ácido dipicolínico), que posee propiedades insecticidas (García *et al.* 2011). Por otra parte, *Lecanicillium lecanii* produce metabolitos secundarios como ácido hidroxicarboxílicos, ácido dipicolínico, fenilalanina anhidra, 2,6 dimetoxi-P-Benzoquinona, aphidicolina y ácido picolínico (Silva 2005).

#### **3.3.1.4 Utilización de dispersantes en la aplicación de hongos entomopatógenos**

La utilización de dispersantes en las formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos ayudan a mejorar la eficacia de estos, ya que disminuye el tiempo de mortalidad del insecto (Walforth *et al.* 2010). Algunos dispersantes compatibles permiten mejorar la cobertura y eficacia de la aplicación, haciendo posible disminuir la cantidad de los insecticidas a aplicar, minimizando las pérdidas por evaporación y deriva. Al mismo tiempo, los dispersantes permiten una mejor penetración de las aplicaciones a través de la cutícula del insecto (Sazo 2008).

Castiglioni (2003), menciona que la acción de los dispersantes sobre los entomopatógenos puede variar en función de la especie y la raza del patógeno, de la naturaleza química de los productos y de las concentraciones utilizadas. Estos productos pueden actuar inhibiendo el crecimiento vegetativo, la conidiogénesis y la esporulación de los microorganismos, así como causar mutaciones genéticas, factores que pueden llevar a la disminución de la virulencia de una plaga determinada.

#### **3.4 Cochinilla harinosa *Pseudococcus elisae***

Los insectos de la familia Pseudococcidae, conocidos como cochinillas o chinches harinosas o algodonosas, se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, se presentan especialmente en las regiones tropicales y subtropicales como plagas de plantas cultivadas y silvestres. Actualmente se conocen a nivel mundial 271 géneros y 2188 especies, de estas un gran número es de interés agrícola. La mayor importancia de estos insectos está relacionada con la habilidad que poseen para convertirse en plagas de las plantas si se introducen en regiones donde no existen sus enemigos naturales (Niebla *et al.* 2010). La cochinilla harinosa del banano *P. elisae* es originaria del continente americano y

fue identificada originalmente en Hawaii; sin embargo, ya se encuentra distribuida en toda la región Neotropical y en algunos países del sureste de Asia (Cubillo 2013).

Según MAG 2015, la mayor distribución de las cochinillas en el país, ha sido en el cultivo de banano en la Región Huetar Atlántica y Norte, desde Sixaola hasta Sarapiquí. Por lo tanto, en el cultivo del banano (*Musa* AAA) las cochinillas se encuentran dentro del complejo de plagas de mayor importancia económica, transformándose en algunas ocasiones como una de las limitantes del sector bananero (Cubillo 2013). Debido a que estos insectos generan pérdidas cuantiosas, las cuales pueden ser por efecto directo o indirecto del insecto. El efecto directo se produce por la picadura del insecto al succionar fluidos del tejido vegetal de diferentes órganos de la planta, ya sea la hoja, la raíz, el pseudotallo, el pinzote o las frutas, lo cual provoca manchas o pecas (Orellana 2007; Guillén *et al.* 2010). El efecto indirecto se da porque la cochinilla harinosa excreta sobre el pinzote, las coronas, e incluso sobre los dedos, una sustancia azucarada que permite la colonización de hongos que producen “fumagina” o costra negra como *Capnodium* sp y *Meliola* sp, lo cual puede afectar la calidad de la fruta y provocar su rechazo por razones cosméticas. Según Apezteguía y Morales 2003, la presentación cosmética del fruto juega un papel preponderante para su venta; la comercialización del producto presenta una serie de normas que exige tanto prácticas sanas de producción, como una alta calidad del fruto, donde no se permite ningún daño al mismo; y su carácter cuarentenario en los diferentes destinos a los cuales se exporta la fruta, donde en algunos casos la presencia del insecto en el producto exportado es motivo de destrucción total del embarque (Guillén *et al.* 2010; Coto y Saunders 2004; Cubillo y Laprade 2005).

En el año 2013 el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), departamento adscrito al Ministerio de Agricultura y Ganadería, declaró emergencia fitosanitaria nacional por el lapso de un año, por el aumento de poblaciones de la escama *Diaspis boisduvalii* y la cochinilla *Pseudococcus elisae*; otorgado por el Estado en el decreto de emergencia N°38008. En el artículo 2° decreta que la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), de manera unilateral o en coordinación con el SFE deberá promover la implementación de medidas enfocadas al manejo integrado de la plaga (productos alternativos amigables con el medio ambiente y los agentes de control biológico). Según datos brindados por CORBANA y la Comisión Nacional de Musáceas estos insectos estuvieron presentes en un estimado de 24 mil hectáreas (SFE 2013); siendo importante indicar que las escamas y las cochinillas son

plagas de gran importancia a nivel comercial, ya que pueden afectar en todas las etapas de desarrollo del cultivo y causar pérdidas de hasta un 100% de la cosecha por rechazo de la fruta para exportación (SFE 2015).

### 3.4.1 Clasificación taxonómica

Según Ramos y Serna (2004) de acuerdo al Cuadro 3, la cochinilla harinosa del banano presenta la siguiente clasificación taxonómica.

**Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *P. elisae*.**

CLASIFICACIÓN	NOMBRE
Orden	Hemiptera
Suborden	Sternorrhyncha
Super familia	Coccoidea
Familia	Pseudococcoidae
Género	<i>Pseudococcus</i>
Especie	<i>P. elisae</i>

Fuente: Ramos y Serna (2004).

El género *Pseudococcus* Westwood (del griego, Pseudo= falso y Kokkos = semilla), es uno de los más abundantes y numerosos de la familia Pseudococcidae, la cual agrupa las especies fitófagas más importantes (Oyarzún 2004).

### 3.4.2 Biología y hábitos de *P. elisae* en plantas de banano

Las cochinillas (Hemiptera: Pseudococidae) poseen un aparato bucal picador-chupador especializado, por lo que se alimentan extrayendo la savia de las plantas. Su sistema digestivo posee un órgano que filtra la savia y excreta hidratos de carbono en forma de mielecilla que expelen al entorno (Ripa *et al.* 2009).

Las hembras adultas y ninfas no tienen alas y frecuentemente se encuentran cubiertas por una cera blanca en polvo o harinosa que secretan. Además, el margen del cuerpo a menudo tiene una serie de filamentos blancos y cera laterales que típicamente son más prominentes. Los machos adultos son alados; si están presentes son de corta duración;

no se alimentan y rara vez son recolectados; su única función es fecundar a las hembras. Algunas especies de cochinillas causan considerables daños económicos a los cultivos agrícolas (Culik *et al.* 2006; Guillén *et al.* 2010).

El insecto vive en colonias de varias decenas de individuos. Una vez que las ninfas eclosionan y salen del ovisaco (masas algodonosas), rápidamente se mueven buscando un sitio ideal para su alimentación y refugio. Los últimos estadios ninfales van perdiendo movilidad, estableciéndose en colonias. Su distribución en el campo no muestra patrones claramente definidos; por el contrario, bajo niveles altos de población, su distribución tiende a ser generalizada. Las plantas recién florecidas son el estado fenológico más apetecido por el insecto y en el cual su efecto es más severo (Guillén *et al.* 2010).

Las cochinillas tienen alta especificidad hacia sus respectivos hospederos, generalmente viven en el pseudotallo, en la cara anterior de las vainas y también en las raíces, siempre en lugares donde no reciben luz; los insectos permanecen en esas condiciones durante todo el ciclo del cultivo. En plantas muy jóvenes es posible encontrar las cochinillas en los brotes o hijuelos, o colonizando las plantas adultas, en las que se hospedan aún después de su cosecha, pues se mantienen alimentándose en éstas hasta la descomposición de los tejidos de los pseudotallos (Armijos 2008).

El tipo de alimentación de las cochinillas harinosas provoca la formación de fumagina en el fruto, lo que puede reducir las posibilidades de comercialización de los productos. Aunque el daño en las plantas no es evidente, la presencia de cochinillas puede ser una preocupación cuarentenaria, sumando los costos del manejo preventivo o de control de estas (Culik *et al.* 2006). Además, *Pseudococcus elisae* participa como vector del virus de estriado del banano (BSV); el proceso de transmisión del virus se inicia cuando las cochinillas se alimentan de plantas enfermas, y en este proceso al tomar los jugos celulares adquieren el BSV y al alimentarse de plantas sanas inoculan el virus (MAG 2015).

### **3.4.3 Ciclo de vida de *P. elisae***

El ciclo de vida de las cochinillas dura alrededor de tres meses, pasando por los estadios de huevo, ninfa y adulto. Las hembras ovipositan en grupos, los huevos dan origen a las ninfas pequeñas y de aspecto blanquecino, las cuales son muy activas en su desplazamiento; luego en su estado adulto se vuelven más sedentarias (Armijos 2008).

La hembra de *P. elisae* presenta el cuerpo achatado en forma oblonga, con 17 pares de cerarios, donde sobresalen 2 pares de filamentos caudales más largos, de tamaño variable entre la mitad de la longitud del cuerpo, la misma longitud de este; el par siguiente tiene el doble de longitud del resto de los cerarios; el cuerpo debajo de la cera es de color rosa anaranjado; la longitud del cuerpo es de 3 a 4 mm sin los caudales (Espinoza 2010).

Sus huevos son de color amarillo claro, con un periodo de incubación medio de 12,4 días, son de forma oblonga y con una fertilidad media del 75%. La ninfa pasa por tres estados: el primero con duración de 8,95 días; el segundo con 9,98 días, y el tercero con 12 días de duración. El periodo de madurez de la hembra hasta el inicio de la ovoposición, es de 8,9 días; la ovoposición dura 21 días y deposita 166 huevos en promedio. El macho es de color oscuro y tiene un par de alas, presenta un par de caudales cerosos, blancos y largos. El tiempo de vida promedio es de 2,5 días. El ciclo de vida de esta especie varía entre 54 a 93 días. Los especímenes permanecen durante toda su vida por debajo de las vainas del pseudotallo, encontrándose una relación muy estrecha entre las hembras en etapa de oviposición y la población de ninfas (INIAP 2004).

#### **3.4.4 Métodos de manejo de *P. elisae***

##### **3.4.4.1 Manejo cultural**

En plantaciones orientadas hacia la exportación de fruta fresca, una práctica cultural utilizada para disminuir la presencia de cochinillas harinosas en las plantas, es el desburille, el cual consiste en la eliminación de la sección distal del pseudotallo de la planta de banano al momento de la cosecha del racimo, así como la eliminación periódica del tejido descompuesto o deteriorado en la porción retenida (Vargas y Cubillo 2010). En caso de presentarse poblaciones de cochinillas en los racimos recién cosechados, una práctica es realizar lavados con agua a presión, con la finalidad de reducir su presencia. Otra práctica es el “aseo”, el cual consiste en eliminar las “malezas” hospederas del insecto que se ubican en el área de la base de la planta de banano (CORBANA 2009); esto también desfavorece la presencia de las hormigas, las cuales mantienen una relación mutualista con las cochinillas, las hormigas protegen y favorecen la dispersión de la plaga, y estas las proveen de miel (Kapranas y Tena 2015).

#### 3.4.4.2 Manejo biológico

De manera general a nivel nacional existen pocas investigaciones de controladores biológicos sobre *P. elisae*. Sin embargo, se han identificado varias especies de insectos benéficos que de forma natural disminuyen las poblaciones de cochinillas; tal es el caso del escarabajo depredador, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleóptero: Coccinellidae) y del grupo de las crisopas (Neuróptera: Chrysopidae), principalmente las pertenecientes a los géneros *Chrysoperla* y *Ceraeochrysa* (Guillén *et al.* 2010). También, Cubillo (2013), registró tres depredadores para el caso de las cochinillas harinosas: dos coccinélidos (*Cycloneda* spp. y *Cryptolaemus montrouzieri*). Sin embargo, el uso de estos insectos benéficos no desarrollan todo su potencial, debido a que en las plantaciones bananeras los sitios de refugio y de alimentación alternos son escasos en comparación a un sistema no disturbado, y el efecto perjudicial de algunos plaguicidas, provoca que las poblaciones de estos sean bajas (Guillén *et al.* 2010).

Además, estudios previos realizados por Castro *et al.* (2010) bajo condiciones de laboratorio, demostraron que algunos metabolitos de *Purpureocillium lilacinum*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, alcanzaron mortalidades entre el 56 y 68% a una concentración al 5% (v/v) a nivel de laboratorio. En este mismo estudio se observó que la aplicación de suspensiones de  $5,7 \times 10^7$  conidios por mililitro de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria fumosoroseus* resultó en niveles de mortalidades entre 60 y 96%.

#### 3.4.4.3 Manejo químico

En el manejo químico, el uso de fundas de polietileno que protegen al racimo del banano, se inició en el Caribe de Costa Rica en 1963, con el propósito de controlar mecánicamente los ataques del trips y se convirtió en una práctica común en la actividad bananera. En la actualidad, la labor es considerada esencial para mejorar el rendimiento (peso del racimo, dimensiones del fruto y días de la floración a la cosecha) y la apariencia del fruto de las plantaciones comerciales dedicadas a la exportación (Vargas y Valle 2011).



Específicamente en el uso de fundas para el manejo de *P. elisae*, es necesario incorporar y rotar los insecticidas específicos para el control de las cochinillas harinosas en combinación con otros productos (imidacloprid+bifentrina y buprofezin+bifentrina), permitiendo no sólo un manejo sobre las cochinillas, sino un manejo total de las otras plagas también importantes del racimo (Cubillo 2013).

Cuando la presión de la plaga es alta, adicionalmente colocan bandas de polietileno impregnadas con clorpirifos al 1% (conocidas como “corbatas”), en la parte inferior del racimo. Y algunas veces se realizan aplicaciones de detergentes, jabones o aceites vegetales refinados de la palma africana, a los pseudotallos recién desburillados, o a las partes superiores de la planta para el manejo de cochinillas (Cubillo 2013).

Asimismo, en el manejo químico de *P. elisae* se considera importante el control de las poblaciones de hormigas, ya que estas sirven a las cochinillas como medio de transporte hacia otras partes de la planta y como protección ante el ataque de enemigos naturales; para esto se utilizan cebos con atrayentes más algún insecticida, colocados cerca de los nidos de las hormigas en recipientes o pedazos de hojas; con el fin de disminuir las poblaciones de hormigas y así ayudar a una posible reducción en la población de las cochinillas harinosas (Cubillo 2013).

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Centro de Control Biológico y Biología Molecular de la Dirección de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional CORBANA, ubicado en la Rita de Guápiles, cantón de Pococí, provincia de Limón, a una altitud de 159. Su ubicación geográfica es 10° 16.116´ latitud Norte y 083° 46.517´ longitud Oeste. La investigación se llevó a cabo entre febrero del 2014 y mayo del 2015, y constó de las siguientes etapas: i. Evaluación de sustratos (naturaleza vegetal) para el mantenimiento de las cochinillas; ii. Evaluación de la eficacia de diversos agentes dispersantes; y iii. Evaluación del efecto de los propágulos y los filtrados metabólicos de hongos entomopatógenos sobre *P. elisae*.

##### 4.1 Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal para el mantenimiento de las cochinillas

Las cochinillas que se utilizaron en el experimento se obtuvieron del insectario que se encuentra en el Centro de Control Biológico de CORBANA, donde utilizan frutos de ayote tipo “mantequilla” (*Cucurbita moschata*) como sustrato para su reproducción (Figura 2), a una temperatura promedio de 27°C, una humedad aproximada del 60% y en condición permanente de oscuridad.

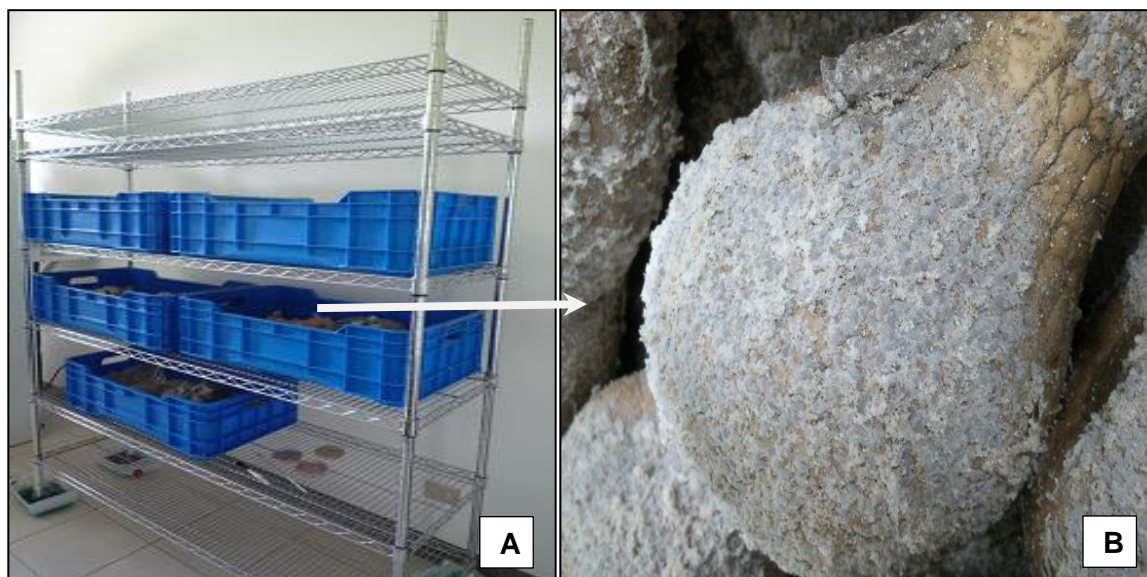


Figura 2. A. Insectario de *P. elisae*, ubicado en CORBANA. B. Frutos de *Cucurbita moschata* colonizados por *P. elisae*.

La selección de los sustratos en primera instancia, estuvo sujeta a los siguientes criterios: tamaño, succulencia y vida de anaquel. De esta forma se evaluaron el chayote quelite (*Sechium edule*), el tacaco (*Frantzia tacaco*), ambos pertenecientes a la familia Cucurbitaceae, y el camote (*Ipomoea batatas*), perteneciente a la familia Solanáceae.

Los vegetales se lavaron con agua de tubo, se escurrieron y se colocaron diez minutos en la cámara de flujo laminar con la luz germicida (ultravioleta  $\lambda_{540\text{nm}}$ ), con el fin de eliminar la presencia de patógenos en la superficie del vegetal. Luego sobre cada vegetal se colocaron 5 cochinillas adultas. Posteriormente, el vegetal se situó dentro de un beaker estéril de 250 ml; el beaker se tapó con papel aluminio con pequeñas perforaciones para permitir el intercambio gaseoso. Los recipientes distribuidos de forma aleatorizada, se pusieron en un estante metálico; cada recipiente con el vegetal y las cochinillas representó una unidad experimental (Figura 3).



**Figura 3. Ubicación de las unidades experimentales para la prueba de selección del sustrato.**

Cada tres días y por espacio de 15 días, se evaluó la mortalidad (%) de las cochinillas. Utilizando un estereoscopio, se consideró que el insecto estaba muerto cuando al voltearlo y estimularlo con un pincel, no se observó ningún tipo de movimiento por un espacio de 15 segundos; las cochinillas vivas se regresaron al recipiente correspondiente.

#### **4.1.1 Diseño experimental y su análisis estadístico**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar, constando de tres tratamientos (vegetales), cada uno con ocho repeticiones. Se realizó un análisis de regresión logística, utilizando el programa estadístico SAS, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y al encontrar diferencias significativas, se realizó una separación de medias utilizando la prueba de Chi-cuadrado de Wald (SAS Institute Inc. 2011) al 5% de significancia.

#### **4.2 Evaluación de la eficiencia de diversos agentes dispersantes**

Para seleccionar el dispersante más eficiente se realizaron tres evaluaciones, con el fin de mejorar la aplicación de la prueba descrita en el apartado 4.3; por lo tanto, se evaluó la humectación del producto sobre el insecto, el efecto mortalidad sobre el insecto y los hongos entomopatógenos. Las evaluaciones se describen a continuación:

##### **4.2.1 Evaluación de la capacidad de los dispersantes para humectar al insecto.**

Para determinar la capacidad de humectación de los productos dispersantes sobre el insecto, se prepararon soluciones acuosas de los mismos a diferentes concentraciones, partiendo de la concentración recomendada por el fabricante (Cuadro 4). Las aplicaciones se realizaron mediante una microjeringa marca HAMILTON, de tal forma que cada insecto (estado adulto y con comportamiento activo) recibió exactamente 1  $\mu$ l de cada solución. A continuación, se determinó visualmente si el líquido penetraba o no las capas cerosas del insecto y si lograba penetrar hasta su cutícula.

Los dispersantes utilizados en la presente investigación fueron:

- Break thru® (Poliéster polimetilsiloxano Copolímero i.a.) coadyuvante no iónico el cual actúa como surfactante, humectante, dispersante y penetrante, presenta compuestos órgano siloxanos modificados para ser usados en mezcla de productos plaguicidas y fertilizantes foliares que se aplican con agua (BASF 2009).

-Cosmo-IN d® (i.a.: Polyoxiethylene Alquil Ether, Alcohol Etoxilado) coadyuvante no iónico, acelerador de penetración (penetrante), surfactante, antiespumante, reductor de tensión e Indicador pH (Alfaro 2009, Solano 2011).

-Traspore® (i.a.: Nonil Fenol Etoxilado, Propilenglicol, diluyentes y acondicionadores) es un poderoso penetrante y humectante coadyuvante (Sagal sf.).

-Limonoil® (i.a.: D-Limonene, Aceite parafínico de petróleo), coadyuvante agrícola natural, no iónico, que entre sus características tiene un fuerte efecto emulsificante, dispersante, humectante y penetrante. Mantiene la estabilidad de las suspensiones y evita la sedimentación. Posee una gran capacidad para reducir la tensión superficial, lográndose una aplicación más eficaz (Agrocosta 2012).

**Cuadro 4. Agentes dispersantes y sus concentraciones evaluadas, como humectantes de la cutícula de la cochinilla harinosa, *Pseudococcus elisae*.**

DISPERSANTE	CONCENTRACIÓN (ml/100 ml agua)	DISPERSANTE	CONCENTRACIÓN (ml/100 ml agua)
<b>COSMO- IN D®</b>	0,2 <sup>1</sup>	<b>BREAK THRU®</b>	0,006 <sup>1</sup>
	0,3		0,009
	0,4		0,012
	0,5		0,015
<b>TRASPORE®</b>	0,5 <sup>1</sup>	<b>LIMONOIL®</b>	0,025 <sup>1</sup>
	0,75		0,0375
	1		0,05
	1,25		0,0675
	1,50		0,075

<sup>1</sup>Concentración recomendada por el fabricante.

La selección se efectuó mediante una evaluación cualitativa del producto, utilizando una escala de medición binomial (sí o no). Para realizar las evaluaciones posteriores, se utilizaron únicamente los dispersantes y su concentración correspondiente, que fue eficaz en humectar a la cutícula del insecto.

## **4.2.2 Efecto directo de los dispersantes sobre la cochinilla.**

Para evaluar si los dispersantes anteriormente seleccionados y sus respectivas concentraciones, inducían por sí mismos la muerte de las cochinillas, a insectos previamente acondicionados en chayotes tal y como se describió en el capítulo 4.1, se les aplicó 1µl de la solución de cada dispersante seleccionado. Las unidades muestrales se acondicionaron a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y cada tres días, por espacio de 12 días, se cuantificó la mortalidad. Para ello se utilizó un estereoscopio y se consideró a un insecto muerto, cuando al voltearlo, no se observó ningún tipo de movimiento por un espacio de 15 segundos.

### **4.2.2.1 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar, constando de dos tratamientos (Cosmo- IN d® y Break thru®) y un testigo absoluto, cada uno con diez repeticiones. La unidad experimental consistió de un chayote con 5 cochinillas adultas. Se realizó un análisis de regresión logística utilizando el programa estadístico SAS, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Debido a que se reportaron tratamientos con mortalidad de cero, en la primera evaluación se realizó una prueba exacta de Fisher (SAS Institute Inc. 2011); posteriormente, dado que se presentaron diferencias entre tratamientos, se realizó una separación de medias utilizando la prueba de Chi-cuadrado de Wald (SAS Institute Inc. 2011) al 5% de significancia.

### **4.2.3 Compatibilidad del dispersante con los hongos entomopatógenos**

Los hongos utilizados en esta prueba se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Control Biológico de CORBANA, en la cual cada microorganismo se encuentra liofilizado dentro de un vial de polipropileno de 3,6 ml de capacidad. Su reactivación se realizó inoculando pequeños fragmentos del liofilizado de cada hongo, en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Luego de un período de incubación ( $26^{\circ}\text{C}$  y en condiciones de oscuridad) de 7 días, las colonias formadas se tomaron como fuente de inóculo para reproducir el hongo, en un sistema bifásico (medio líquido Saboraud Liquid Medium), para luego escalarlo en un medio sólido (mezcla de arroz y granza), siguiendo los protocolos desarrollados por CORBANA.

La compatibilidad de los hongos a evaluar se determinó mediante su exposición a los dispersantes y sus concentraciones correspondientes que fueron seleccionados por su capacidad de humectabilidad (punto 4.2.1) y su efecto directo (punto 4.2.2) sobre las cochinillas. Para tal fin, se evaluó el efecto de los tratamientos seleccionados (punto 4.2.3.1), para lo cual se prepararon suspensiones compuestas por los hongos seleccionados a una concentración de  $5,0 \times 10^7$  conidios/gr, en soluciones del dispersante Break thru®, a una concentración al 0,06%. Tales soluciones se sometieron a agitación orbital por espacio de dos horas, simulando el tiempo y las condiciones que se presentan durante una aplicación en el campo. Terminado este período, una alícuota de 1 ml de cada solución, se diluyó hasta  $10^{-4}$ , y 100  $\mu$ l de esta se inocularon en un plato petri con medio PDA. Los platos fueron incubados a 25°C por espacio de 16 horas y bajo el microscopio se cuantificó el número de conidios germinados sobre un total de 50 conidios evaluados para determinar el porcentaje de viabilidad.

#### **4.2.3.1 Diseño experimental y su análisis estadístico**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar, constando de cuatro tratamientos (con ocho repeticiones por tratamiento): T1: Break thru® + ENTO-01 (*B. bassiana*), T2: Break thru® + ENTO-29 (*M. anisopliae*), T3: Break thru® + PL-11 (*P. lilacinum*), T4: Break thru® + LL-56 (*L. lecanii*). Posteriormente, se realizó un análisis de regresión logística utilizando el programa estadístico SAS, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### **4.3 Efecto de los propágulos y los filtrados metabólicos de hongos entomopatógenos sobre *Pseudococcus elisae*, bajo condiciones de laboratorio.**

A continuación, se describen las fases para evaluar la mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y los filtrados metabólicos de hongos entomopatógenos:

### 4.3.1 Origen de los hongos entomopatógenos utilizados

En el estudio se utilizaron 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, provenientes de la colección del Laboratorio de Control Biológico de CORBANA (Cuadro 5), conservados bajo liofilización y originarios de fincas bananeras de la Región Huetar Atlántica; dichos aislamientos fueron previamente seleccionadas debido a su alta patogenicidad hacia *Galleria mellonella* (LEP: Pyralidae) como organismo indicador a nivel de laboratorio (Rodríguez 2014).

**Cuadro 5. Hongos entomopatógenos empleados en la prueba de patogenicidad (suspensión conidial) y de eficacia de metabolitos secundarios.**

HONGO	CÓDIGO*
<i>Beauveria bassiana</i>	ENTO-01
	ENTO-03
	ENTO-05
	ENTO-12
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ENTO-23
	ENTO-24
	ENTO-25
	ENTO-29
	ENTO-33
	ENTO-34
	ENTO-36
	MA-15
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	PL-10
	PL-11
	PL-12
<i>Lecanicillium lecanii</i>	LL-56

\*Códigos asignados a los aislamientos de hongos entomopatógenos, por el laboratorio de control biológico de CORBANA.



### 4.3.2 Producción de propágulos y metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos, utilizando dos agentes inductores de enzimas líticas.

En primera instancia, el material biológico liofilizado de cada hongo fue reactivado en platos Petri con medio de cultivo PDA. Los platos se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad durante 7 días hasta observar colonias puras y esporuladas.

A continuación, se prepararon los medios inductores líquidos: i. Sabouraud Liquid Medium; ii. Medio enriquecido con quitina coloidal preparada según la metodología descrita por Carr (2009), para inducir la producción de quitinasas; iii. Medio enriquecido con cutícula de *G. mellonella* como fuente de proteína (Anexo 1, protocolo utilizado para el procesamiento de la cutícula), para inducir la producción de proteasas. La composición de los medios inductores se detalla a continuación (Cuadros 6 al 8):

**Cuadro 6. Composición del medio inductor Sabouraud Liquid Medium.**

COMPUESTO	CANTIDAD (gr) / 375 ml
Sabouraud Liquid Medium	11,25
Extracto de levadura	1,87
Leche de soya	3,75

**Cuadro 7. Composición del medio inductor enriquecido con quitina\*.**

COMPUESTO	CANTIDAD (gr) / 375 ml
Extracto de levadura	0,75
Glucosa	3,75
Nitrato de Potasio	1,125
Fosfato Monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,75
Quitina	1,875

\*El pH del medio se ajustó a 6.

**Cuadro 8. Composición del medio inductor con adición de cutícula**

COMPUESTO	CANTIDAD (gr) / 375 ml
Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	0,0375
Fosfato Monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,075
Fosfato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0,075
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,0375
Cloruro de Zinc ( $\text{ZnCl}_2$ )	0,0375
Cutícula de <i>G. mellonella</i>	3,75

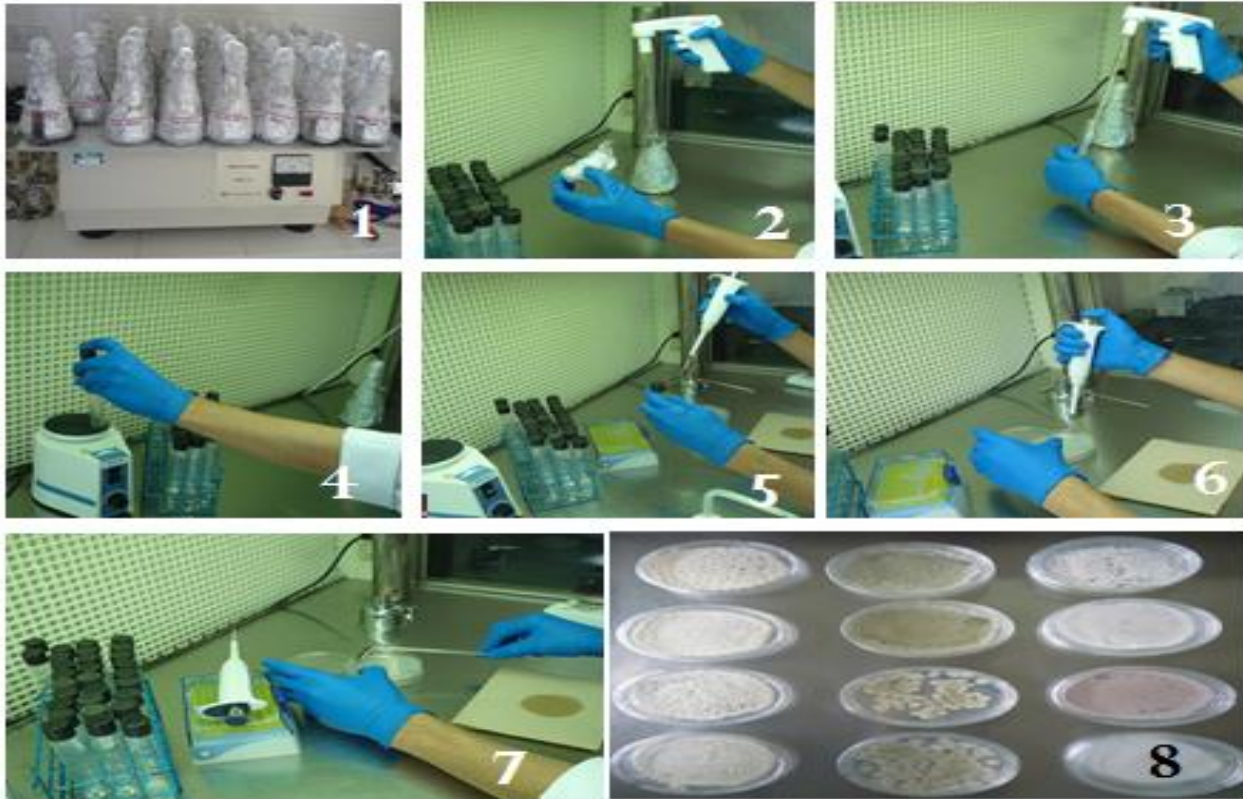
Posteriormente, 125 ml de cada medio inductor fue depositado de en erlenmeyer de 250 ml de capacidad y estos fueron esterilizados a  $121^\circ\text{C}$  por espacio de 15 minutos. Luego se les agregó la cuarta parte del hongo correspondiente, producido en los platos Petri (Figura 4). Los medios inductores líquidos se cubrieron con papel aluminio para evitar la entrada de luz, y se sometieron a agitación orbital (120 RPM), a una temperatura de  $24\pm 2^\circ\text{C}$ , por un periodo de siete días.



**Figura 4. Inoculación de los medios inductores**

Al cuarto día después la inoculación de los hongos, se determinó la pureza de los cultivos; para ello se realizó el siguiente procedimiento (Figura 5): primero se procedió a realizar series decimales de dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), para cada cultivo se trasladó un 1 ml de la solución madre a un tubo de ensayo estéril con 9 ml de agua destilada; de esta manera se hizo la primera dilución ( $10^{-1}$ ); el tubo que contenía la primera dilución se agitó hasta homogenizar el contenido, luego se tomó una alícuota de 1 ml y se depositó en un segundo tubo de ensayo ( $10^{-2}$ ) con la misma cantidad de agua destilada estéril (9 ml),

dicha dilución se agitó durante 30 segundos; posteriormente por medio de una micropipeta se tomó una alícuota 1  $\mu\text{L}$  de la solución ( $10^{-2}$ ) y se inoculó en platos petri con PDA acidificado (pH 4,8) para favorecer el crecimiento de hongos, y con agar nutriente para determinar la presencia de bacterias contaminantes; finalmente cuatro días después de realizada la prueba, se revisaron los platos inoculados para verificar su pureza.



**Figura 5. Esquematización del sistema de determinación de la pureza de los medios inductores líquidos: 1. Agitación orbital de los medios de cultivo; 2. Extracción de 1 ml de la solución madre; 3. Preparación de la primera dilución  $10^{-1}$ ; 4. Agitación de la dilución  $10^{-1}$ ; 5. Preparación de la dilución  $10^{-2}$ ; 6. Deposito de 1  $\mu\text{L}$  de la solución ( $10^{-2}$ ) en platos petri con PDA; 7. Rayado de la solución sobre el medio PDA; 8. Revisión de la pureza de los platos inoculados.**

Para el escalamiento de los hongos (producción de propágulos), se utilizaron bolsas de polipropileno conteniendo un sustrato compuesto por 200 g de arroz, 100 g de granza de arroz y 90 ml de agua destilada. Las bolsas fueron esterilizadas a  $121^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos y  $1\text{kg}/\text{cm}^2$  de presión. Estas bolsas fueron inoculadas con 20 ml de biomasa producida en cada medio inductor (estos con siete días de inoculados) (Figura 6). El material inoculado

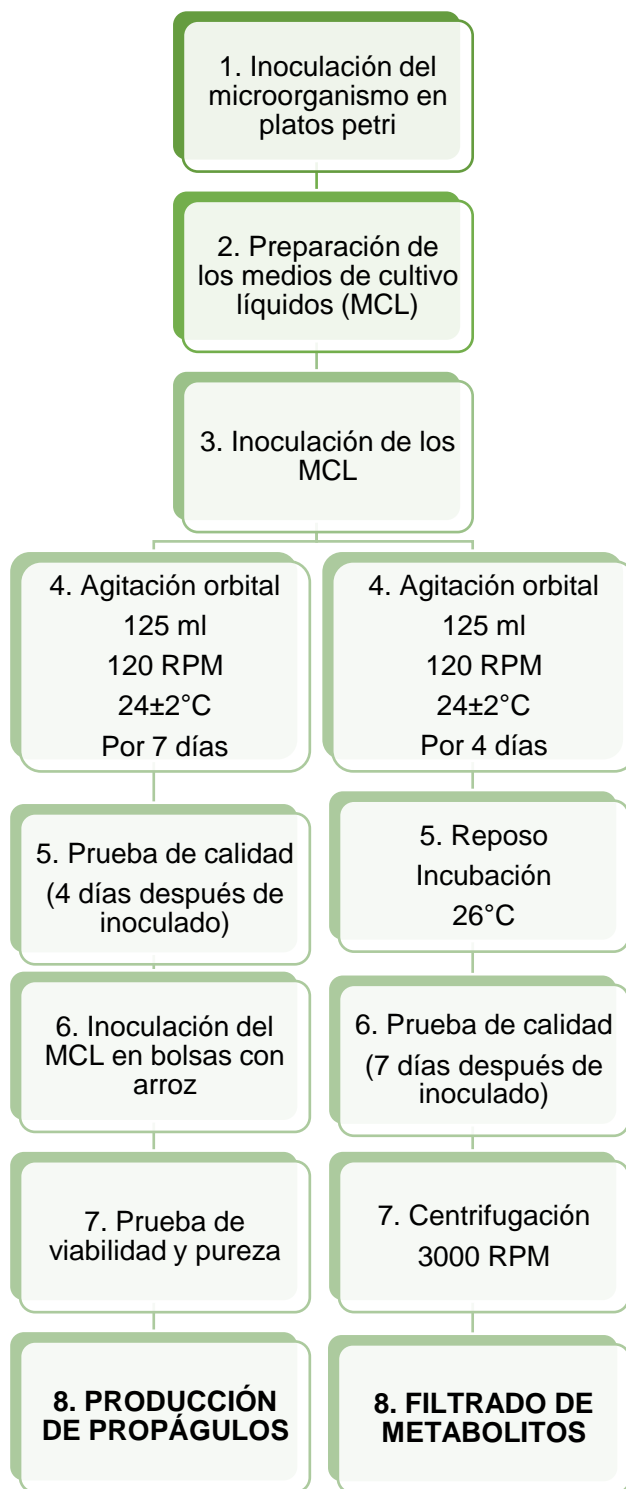
se incubó en estantes metálicos dentro de salas a 25°C; al décimo día se le determinó la viabilidad y pureza según la metodología descrita en el Anexo 2. El periodo total de incubación fue de 12 días, en este último día se determinó la concentración de conidios.



**Figura 6. Inoculación de bolsas con arroz y granza, y su incubación para la producción de conidios.**

Para la producción de metabolitos secundarios de los diferentes hongos, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la elaboración de los medios de cultivos líquidos, pero con la diferencia de que en el cuarto día después de inocular los hongos en los medios líquidos, se suspendió su agitación y los cultivos se trasladaron a una incubadora (26°C), donde se mantuvieron estáticos durante 10 días en condiciones de oscuridad. La prueba de pureza (mismo procedimiento descrito anteriormente) se realizó siete días después de inoculados los cultivos líquidos. Durante este período se presenta la idiofase de los hongos, en la cual se produce la mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Al concluir este período, los cultivos se centrifugaron a 3000 RPM durante 10 minutos y bajo condiciones de asepsia, el líquido sobrenadante se sometió a filtración utilizando filtros de nitrocelulosa de 4,7 cm de diámetro y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Se obtuvo un total de 30 ml de filtrado a partir de cada cultivo. Los filtrados se almacenaron en tubos cónicos con tapa de rosca, estériles, de 50 ml de capacidad y se almacenaron en condiciones de oscuridad y a temperatura de 3°C (Figura 7).



**Figura 7. Esquematación del proceso para la producción de propágulos y metabolitos.**

### 4.3.3 Tratamientos aplicados

Cada aislamiento evaluado se sometió a cinco tratamientos (Cuadro 9), los cuales consistieron en: i. Propágulos producidos en medio inductor Saboraud Liquid Medium; ii. Propágulos producidos en medio enriquecido con quitina coloidal; iii. Propágulos producidos en medio enriquecido con cutícula de *Galleria mellonella*; iv. Filtrado Metabólico con adición de quitina. v. Filtrado Metabólico con adición de cutícula. Los propágulos se aplicaron a una concentración de  $5,0 \times 10^7$  conidios/ml, mientras que los filtrados a una concentración del 5%.

**Cuadro 9. Tratamientos utilizados para la evaluación de propágulos y metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos.**

N°	TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	ABREVIATURA
1	Propágulos producidos con Saboraud Liquid Medium	$5,0 \times 10^7$ conidios/ml	PSLM
2	Propágulos producidos con adición de quitina coloidal	$5,0 \times 10^7$ conidios/ml	PQ
3	Propágulos producidos con adición de cutícula de <i>Galleria mellonella</i>	$5,0 \times 10^7$ conidios/ml	PP
4	Filtrado metabólico producidos con adición de quitina coloidal	5%	MQ
5	Filtrado metabólico producidos con adición de cutícula de <i>Galleria mellonella</i>	5%	MP
6	Testigo	-	T

Tanto la aplicación de los tratamientos con propágulos infectivos, como la de los filtrados metabólicos se realizó en un ambiente estéril, dentro de una cámara de flujo laminar.

En el caso de los propágulos, se tomó 10 gr del sustrato colonizado por el respectivo hongo y se suspendió en 100 ml de agua estéril (con 0,05% de Tween 80). Luego se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$  (procedimiento desarrollado en el punto 4.3.2) para determinar la concentración de conidios viables/gramo de la muestra (procedimiento descrito en el Anexo 3). Posteriormente se calcularon los gramos del sustrato sólido (el cual contenía el medio inductor más el hongo entomopatógeno) necesarios a disolver en 500 ml de agua estéril con 0,05% de Tween 80, a una concentración de  $5,0 \times 10^7$  conidios (100% viables)/ml, para formular la suspensión final a aplicar.

Para los tratamientos con filtrados metabólicos (FM), se preparó una solución al 5% (v/v) del filtrado puro. Las concentraciones fueron seleccionadas mediante investigaciones previas no publicadas, realizadas en el laboratorio de Control Biológico de CORBANA.

Finalmente, se le aplicó a cada insecto 1,0  $\mu$ l de la suspensión de los tratamientos respectivos con la ayuda de una microjeringa (Figura 8).



**Figura 8. Aplicación de los tratamientos de un determinado bioensayo.**

Debido al prolongado lapso de tiempo que implica evaluar cada hongo en sus 5 diferentes tratamientos, se consideró dividir el estudio en 6 bioensayos; en los bioensayos 1, 2, 3 y 5 se evaluaron tres aislamientos de diferentes géneros (experimentos factoriales 5x3), y en los bioensayos 4 y 6, se utilizaron dos aislamientos (experimentos factoriales 5x2). Los aislamientos evaluados en cada bioensayo se detallan en el Cuadro 10. En cada bioensayo se agregó un testigo absoluto (sin la aplicación de hongos), para medir el posible efecto del manipuleo del insecto, sobre su mortalidad.

**Cuadro 10. Distribución de los aislamientos de hongos entomopatógenos según bioensayos.**

<b>N° DE BIOENSAYO</b>	<b>AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS</b>		
1	ENTO-01 <i>B. bassiana</i>	ENTO-29 <i>M. anisopliae</i>	PL-11 <i>P. lilacinum</i>
2	ENTO-05 <i>B. bassiana</i>	ENTO-23 <i>M. anisopliae</i>	PL-10 <i>P. lilacinum</i>
3	ENTO-03 <i>B. bassiana</i>	LL-56 <i>L. lecanii</i>	MA-15 <i>M. anisopliae</i>
4	ENTO-24 <i>M. anisopliae</i>	ENTO-25 <i>M. anisopliae</i>	
5	ENTO-34 <i>M. anisopliae</i>	ENTO-36 <i>M. anisopliae</i>	ENTO-12 <i>B. bassiana</i>
6	ENTO-33 <i>M. anisopliae</i>	PL-12 <i>P. lilacinum</i>	



#### 4.3.4 Diseño experimental

Las unidades experimentales consistieron de un chayote con cinco cochinillas adultas dentro de un vaso desechable de 14 onzas de capacidad (Figura 9); el vaso contenía en el fondo un anillo de algodón, al que se le aplicó 5 ml de agua destilada estéril con el fin de mantener una humedad aproximada al 90%. El vaso se cubrió con papel aluminio con pequeñas perforaciones para permitir el intercambio gaseoso. Las unidades experimentales se establecieron un día antes de cada aplicación, con el objetivo de que los insectos tuvieran un periodo de aclimatación.



**Figura 9. Recipiente plástico donde se ubicó el sustrato.**

El diseño experimental que se utilizó para cada bioensayo fue completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento (Figura 10),



**Figura 10. Acondicionamiento de las unidades experimentales.**

#### **4.3.5 Variables medidas**

Las variables medidas fueron el número de insectos vivos y de insectos muertos; con estos datos se calculó el porcentaje de mortalidad. Se consideró que el insecto estuviese muerto cuando al voltearlo no se observase ningún movimiento por un espacio de tiempo de 30 segundos. La variable analizada fue la mortalidad de las cochinillas en un periodo de 8 días.

#### **4.3.6 Análisis estadístico**

Para cada bioensayo se realizó un análisis estadístico utilizando el modelo lineal generalizado, usando la función logito como función vinculante [ $\text{Logito}(x) = \log [p(x) / (1-p(x))]$ ]. El análisis se hizo en dos pasos: primero se aplicó un modelo unifactorial donde todas las combinaciones de tratamientos x aislamientos se compararon con el testigo mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Wald y luego se analizó la estructura bifactorial (5 x3 en los bioensayos 1, 2, 3 y 5; y 5x2 en los bioensayos 4 y 6).

Posteriormente, los datos de mortalidad se corrigieron sustrayendo la mortalidad promedio del testigo. Con estos datos se analizó el conjunto factorial de los 16 aislamientos de hongos entomopatógenos x 5 medios de crecimiento, aplicando un análisis de regresión logística. Para los análisis se utilizó el software Proc Genmod de SAS/STAT, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal, para el mantenimiento de las cochinillas

En el Cuadro 11 se presentan los porcentajes de mortalidad de las cochinillas utilizando los tres sustratos vegetales (chayote, camote y tacaco) en un periodo de tiempo de 15 días. Solo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos al quinceavo día después de la colocación de los insectos sobre los vegetales ( $Pr < 0,0196$ ), momento en el cual el chayote presentó menores porcentajes de mortalidad de las cochinillas (44,4%), en comparación con el camote (66,7%) y el tacaco (74,4%).

**Cuadro 11. Porcentaje de mortalidad de las cochinillas, de acuerdo al sustrato vegetal de alimentación.**

DÍAS DESPUES DE COLOCACIÓN DEL INSECTO SOBRE EL VEGETAL	N° INDIVIDUOS	TRATAMIENTO	MORTALIDAD <sup>1</sup> %
4	38	Chayote	0,0 a
	39	Tacaco	0,0 a
	39	Camote	0,0 a
<b>Pr &gt; 1,00</b>			
8	36	Chayote	5,3 a
	37	Tacaco	5,4 a
	37	Camote	10,8 a
<b>Pr &gt; 0,5897</b>			
12	36	Chayote	30,6 a
	37	Tacaco	16,2 a
	37	Camote	31,6 a
<b>Pr &gt; 0,2234</b>			
15	36	Chayote	44.4 a
	37	Tacaco	74.4 b
	36	Camote	66.7 b
<b>Pr &lt; 0,0196</b>			

<sup>1</sup> Medias de tratamiento con igual letra no difieren entre sí según prueba de Chi-cuadrada de Wald a 5% de significancia.

Durante el experimento se evidenció que la cochinilla harinosa desarrolló exitosamente su ciclo de vida en los frutos de chayote (Figura 11), caso contrario sucedió en el camote y el tacaco, donde los insectos presentaron baja producción de cera y ovisacos (Figura 12). Por lo tanto, se seleccionó el fruto de chayote para las pruebas posteriores, al ser el sustrato que presentó una menor mortalidad de los insectos (al octavo y quinceavo día después de la colocación de las cochinillas sobre el chayote), favoreciendo condiciones para la alta producción de cera y ovisacos.



**Figura 11. Frutos de chayote colonizados por cochinillas.**



**Figura 12. Escaso desarrollo de ovisacos de la cochinilla harinosa del banano, en frutos de tacacos y tubérculos de camote.**

## 5.2 Eficacia de los agentes dispersantes

### 5.2.1 Efecto de los dispersantes sobre la mortalidad de las cochinillas harinosas

Los dispersantes Traspore® y Limonoil® fueron descartados ya que a dosis cuatro veces mayor a la recomendada por el fabricante no humectó la capa cerosa de la cochinilla harinosa (Cuadro 12). Caso contrario ocurrió con Cosmo- IN d® que a una concentración de 0,8% (dosis cuatro veces mayor a la recomendada por el fabricante), logró humectar la capa cerosa del insecto. El dispersante Break thru® humectó la capa cerosa del insecto utilizando la dosis recomendada por el fabricante, que fue de 0,06% (Figura 13).

**Cuadro 12. Eficacia de los dispersantes para penetrar las capas serosas y humectar a la cochinilla a diferentes concentraciones del producto comercial.**

DISPERSANTE	CONCENTRACIONES EVALUADAS Y SELECCIONADAS DE LOS DISPERSANTES								
<b>Break thru®</b>	0,006								
	X								
<b>Cosmo-IN D®</b>	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8		
	-	-	-	-	-	-	X		
<b>Traspore®</b>	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Limonoil®</b>	0,025	0,037	0,05	0,0625	0,75	0,875	1	1,12	1,25
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Utilización del símbolo (X) para resultados positivos, y del símbolo (-) para negativos de humectación y penetración del dispersante.



**Figura 13. Eficacia de Break thru® (0,06%) como agente humectante sobre la cutícula de la cochinilla.**

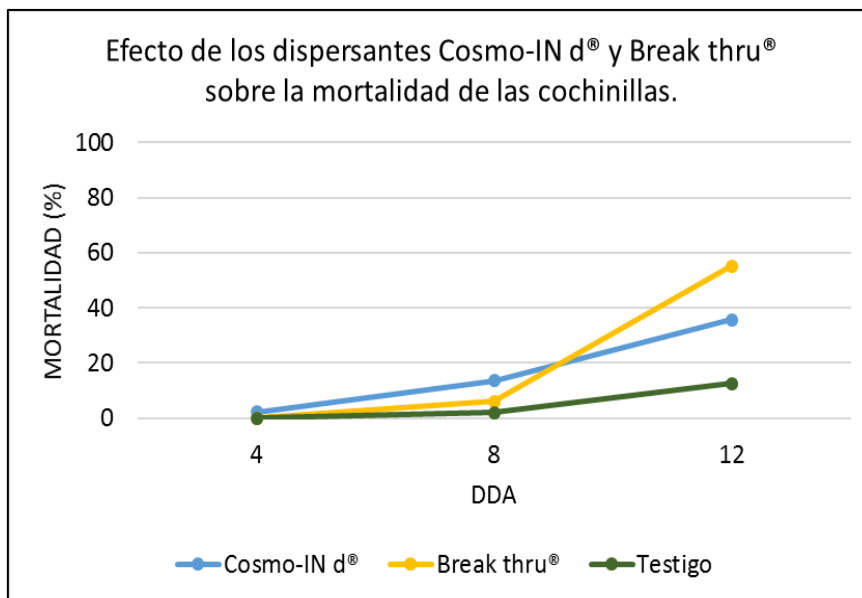
Por lo mencionado anteriormente, se seleccionaron Break thru® y Cosmo- IN d®, a los cuales se les evaluó su efecto sobre la mortalidad de las cochinillas. En el Cuadro 13, se presentan los porcentajes de mortalidad de las cochinillas tratadas con los dispersantes seleccionados. Se observa que al cuarto día después de la aplicación (DDA), no hubo diferencias significativas ( $P > 0,3241$ ); no obstante, Cosmo- IN d® presentó un 2,1% de mortalidad sobre las cochinillas, mientras que Break thru® no afectó al insecto. Al octavo día DDA tampoco se reportan diferencias significativas ( $P > 0,083$ ); sin embargo, el dispersante que produjo una menor mortalidad sobre los insectos con respecto al testigo fue Break thru® con un 6% (Figura 14). Al doceavo día DDA todos los tratamientos difirieron entre sí ( $P < 0.0001$ ), siendo Cosmo- IN d® el dispersante que presentó un menor porcentaje de mortalidad (35,6%). Por lo tanto, al utilizar para las aplicaciones Break thru® la dosis recomendada por el fabricante, no presentar porcentajes de mortalidad sobre los insectos al cuarto día DDA y presentar en el octavo día el menor porcentaje de mortalidad comparado con Cosmo-IN d®; se seleccionó dicho dispersante para las pruebas posteriores.

**Cuadro 13. Efecto de los dispersantes Cosmo-IN d® y Break thru® sobre la mortalidad de las cochinillas.**

DDA	TRATAMIENTO	N <sup>1</sup>	MORTALIDAD <sup>2</sup> (%)
4	Cosmo-IN d®	47	2,1 a
	Break thru®	50	0,0 a
	Testigo	49	0,0 a
	<b>Pr&gt;Z</b>		<b>0,3241</b>
8	Break thru®	50	6,0 a
	Cosmo-IN d®	44	13,6 a
	Testigo	48	2,0 a
	<b>Pr&gt;Chi-Cuadrado</b>		<b>0,083</b>
12	Cosmo-IN d®	44	35,6 b
	Break thru®	49	55,1 c
	Testigo	48	12,5 a
	<b>Pr&gt;Chi-Cuadrado</b>		<b>&lt;0,0001</b>

<sup>1</sup>N: Número de insectos vivos

<sup>2</sup> Medias de tratamiento con igual letra no difieren entre sí según prueba de Chi-cuadrada de Wald a 5% de significancia.



**Figura 14. Efecto de los dispersantes Cosmo-IN d® y Break thru® sobre la mortalidad de las cochinillas.**

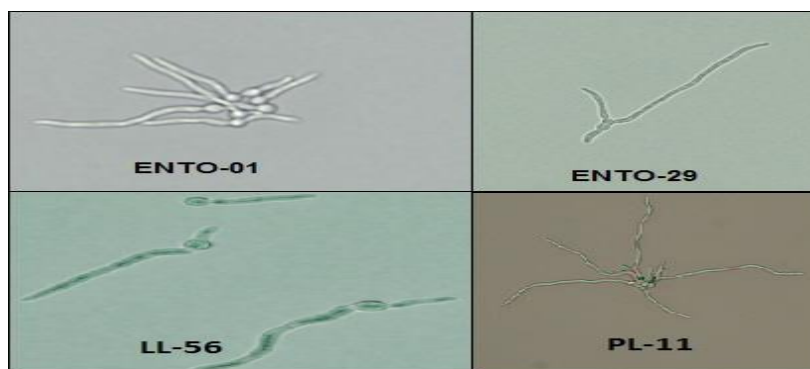
### 5.2.2 Compatibilidad de Break thru® con los hongos entomopatógenos.

El dispersante Break thru® no presentó un efecto negativo sobre la germinación de los aislamientos ENTO-01, ENTO-29, PL-11 y LL-56, los cuales corresponden a *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii* y *P. lilacinum*, respectivamente. Entre los tratamientos no se presentaron diferencias significativas ( $Pr > 0,1951$ ), siendo el menor porcentaje de viabilidad un 98,3% correspondiente al tratamiento de *M. anisopliae* + Break thru® (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Porcentaje de viabilidad de conidios de cuatro aislamientos de hongos entomopatógenos, tratados con Break thru®, en condiciones *in vitro*.**

TRATAMIENTO <sup>1</sup>	N° PROMEDIO DE CONIDOS GERMINADOS	VIABILIDAD %
<i>M. anisopliae</i> + Break thru®	49,1	98,3 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i> + Break thru®	49,3	98,5 <sup>a</sup>
<i>L. lecanii</i> + Break thru®	49,6	99,3 <sup>a</sup>
<i>P. lilacinum</i> + Break thru®	49,8	99,5 <sup>a</sup>
<b>Pr &gt; 0,2610</b>		

En la figura 15 se evidencia un normal desarrollo de los tubos germinativos y una germinación típica de los conidios de las cuatro especies de hongos evaluadas (*B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii* y *P. lilacinum*), lo cual demostró su compatibilidad con Break thru®.



**Figura 15. Conidios germinados de *B. bassiana* (ENTO-01), *M. anisopliae* (ENTO-29), *L. lecanii* (LL-56) y *P. lilacinum* (PL-11), expuestos a Break thru®.**



### **5.3 Mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos metabólicos de los hongos entomopatógenos.**

#### **5.3.1 Resultados individuales para cada bioensayo.**

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en los seis bioensayos se muestran en los cuadros 15 a 20. Los resultados de los bioensayos 1, 2 y 3 evidenciaron un efecto positivo de todos los tratamientos (propágulos y filtrados crudos metabólicos) sobre la mortalidad de los insectos, independientemente del aislamiento del hongo entomopatógeno. En el bioensayo 4 solo el aislamiento ENTO-24 con el tratamiento PSLM, el aislamiento ENTO-25 con los tratamientos PP y PQ, respectivamente, no mostraron diferencias significativas con el testigo ( $P \geq 0,0528$ ). En el bioensayo 5, el aislamiento ENTO-34 con el tratamiento MQ, ENTO-36 con el MP y ENTO-12 con los tratamientos MQ y PP no difirieron significativamente con el testigo ( $P \geq 0,0751$ ). En el bioensayo 6, el aislamiento PL-12 con el tratamiento MQ, el aislamiento ENTO-33 con los tratamientos SLM y MQ no mostraron diferencias significativas con el testigo ( $P \geq 0,0756$ ).

En el bioensayo N°1 (Cuadro 15) los mayores porcentajes de mortalidad los presentaron los aislamientos ENTO-01 con los tratamientos MQ (53,3%) y PQ (50%), ENTO-29 con PQ (50%) y PL-11 con el tratamiento PQ (50%); El testigo presentó un 3,3% de mortalidad sobre los insectos.

**Cuadro 15. Bioensayo N°1; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *B. bassiana* (ENTO-01), *M. anisopliae* (ENTO-29) y *P. lilacinum* (PI-11).**

HONGO	TRATAMIENTO <sup>1</sup>	Lógito <sup>2</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD* %
<i>B. bassiana</i> Ento-01	PSLM	-0.69±0.39	33,3
	PQ	0.00±0.37	50,0
	PP	-0.41±0.37	40,0
	MQ	0.13±0.37	53,3
	MP	-0.69±0.39	33,3
<i>M. anisopliae</i> Ento – 29	PSLM	-0.41±0.37	40,0
	PQ	0.00±0.37	50,0
	PP	-0.55±0.38	36,7
	MQ	-0.13±0.37	46,7
	MP	-0.55±0.38	36,7
<i>P. lilacinum</i> PL-11	PSLM	-0.55±0.38	36,7
	PQ	0.00±0.37	50,0
	PP	-1.19±0.43	23,3
	MQ	-0.55±0.38	36,7
	MP	-0.41±0.37	40,0
	TESTIGO	-3.37±1.02	3,3
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0.0036</b>			

<sup>1</sup>Tratamiento= Significado de las siglas expuesto en el apartado 4.3.3 (Cuadro 9).

<sup>2</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Todos los tratamientos difirieron significativamente del testigo (P≤0,0487), según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

En el cuadro 16 se muestran los resultados del bioensayo N°2, los aislamientos y los tratamientos que presentaron mayores porcentajes de mortalidad de los insectos fueron: ENTO-05 –PSLM (73,3%), ENTO-05 –PQ (56,7%) y ENTO-05 –PP (53,3%); convirtiendo el aislamiento ENTO-05 en uno de los más promisorios por su alta capacidad de infestar al insecto. El testigo mostró un 3% de mortalidad de los insectos.

**Cuadro 16. Bioensayo N°2; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *B. bassiana* (ENTO-05), *M. anisopliae* (ENTO-23) y *P. lilacinum* (PI-10).**

HONGO	TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD* %
<i>B. bassiana</i> ENTO-05	PSLM	1,01±0,41	73,3
	PQ	0,27±0,37	56,7
	PP	0,13±0,37	53,3
	MQ	-0,27±0,37	43,3
	MP	-0,55±0,38	36,7
<i>M. anisopliae</i> ENTO-23	PSLM	-0,27±0,37	43,3
	PQ	-0,55±0,38	36,7
	PP	-0,69±0,39	33,3
	MQ	-1,19±0,43	23,3
	MP	-0,85±0,40	30,0
<i>P. lilacinum</i> PL-10	PSLM	-1,01±0,41	26,7
	PQ	-0,69±0,39	33,3
	PP	-1,01±0,41	26,7
	MQ	-0,41±0,37	40,0
	MP	-0,55±0,38	36,7
	TESTIGO	-3,37±1,02	3,3
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0.0001</b>			

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Todos los tratamientos difirieron significativamente del testigo (P≤0,0487), según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

La figura 16 muestra: A) un insecto momificado por *B. bassiana* (ENTO-05 –SLM); B) conidióforos típicos de *B. bassiana* presentes sobre la cutícula del insecto.



**Figura 16. A) *Pseudococcus elisae* momificado por *Beauveria bassiana* (ENTO-05); B) detalle de conidióforo de *B. bassiana* presente sobre la cutícula del insecto (40X).**

En el bioensayo N°3 (Cuadro 17) el testigo no presentó mortalidad sobre los insectos. El aislamiento LL-56 con los tratamientos MQ con un 50%, PP, PQ y MP con un 46,7%, presentaron los mayores porcentajes de mortalidad de las cochinillas.

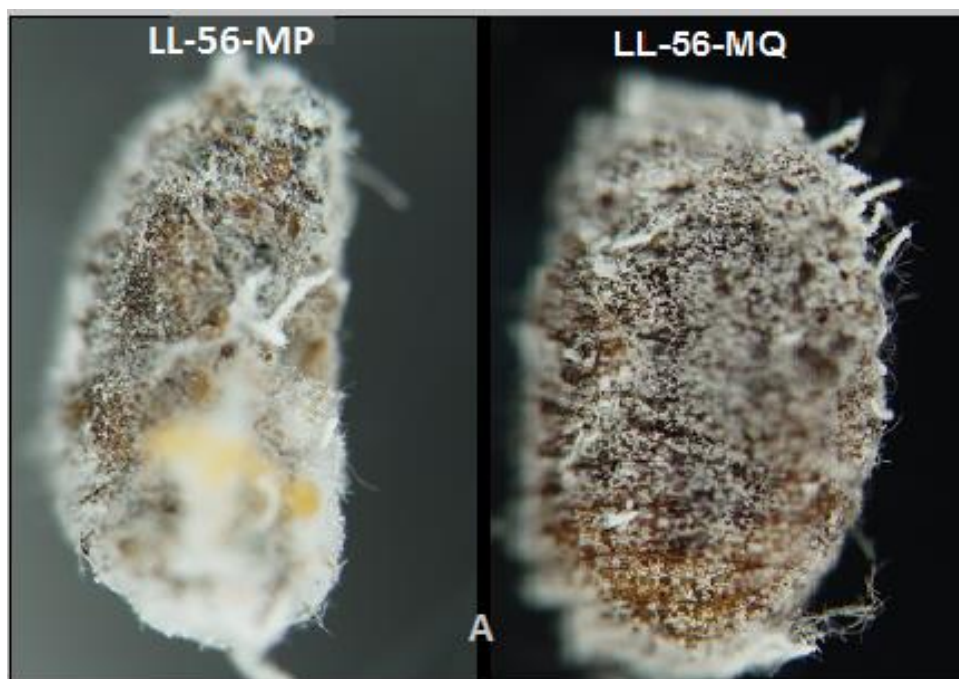
**Cuadro 17. Bioensayo N°3; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *B. bassiana* (ENTO-03), *L. lecanii* (LL-56) y *M. anisopliae* (MA-15).**

HONGO	TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD* %
<i>B. bassiana</i> ENTO-03	PSLM	-1,01±0,41	26,7
	PQ	-0,55±0,38	36,7
	PP	-0,69±0,39	33,3
	MQ	-0,85±0,40	30,0
	MP	-0,55±0,38	36,7
<i>L. lecanii</i> LL-56	PSLM	-0,13±0,37	46,7
	PQ	-0,13±0,37	46,7
	PP	-1,19±0,43	23,3
	MQ	0,00±0,37	50,0
	MP	-0,13±0,37	46,7
<i>M. anisopliae</i> MA-15	PSLM	-0,55±0,38	36,7
	PQ	-0,41±0,37	40,0
	PP	-0,41±0,37	40,0
	MQ	-0,69±0,39	33,3
	MP	-1,19±0,43	23,3
	TESTIGO	-25,37±0,38	0,0
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0.0005</b>			

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Todos los tratamientos difirieron significativamente del testigo (P≤0,0001), según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

En la figura 17 se evidencia el efecto de las enzimas, toxinas o metabolitos secundarios de naturaleza proteolítica (LL-56 –MP) y quitinolítica (LL-56 –MQ) del aislamiento LL-56, mostrándose insectos con coloraciones oscuras producto de diversos mecanismos que provocaron la deshidratación del insecto.



**Figura 17. Cochinillas tratadas con metabolitos de naturaleza proteolítica y quitinolítica del aislamiento LL-56.**

En el bioensayo N°4 (Cuadro 18), el aislamiento ENTO-24 con los tratamientos PQ (56,7%), MQ (50%), PP (46,7%) y ENTO-25 con el tratamiento PQ (46,7%), fueron los que mostraron los mayores porcentajes de mortalidad de los insectos; tales aislamientos pertenecientes a la especie *M. anisopliae*. Por el contrario, los aislamientos y sus tratamientos, ENTO-25 –MQ (26,7%), ENTO-25 –MP (23,3%) y ENTO-24 –PSLM (16,7%) presentaron los menores porcentajes de mortalidad de las cochinillas. El testigo presentó un 6,7% de mortalidad de los insectos.

**Cuadro 18. Bioensayo N°4; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *M. anisopliae* (ENTO-24 y ENTO-25).**

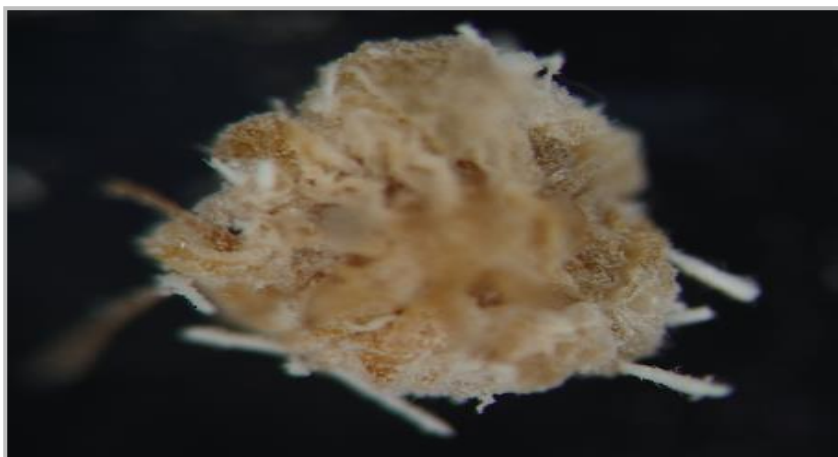
HONGO	TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD %
<i>M. anisopliae</i> ENTO-24	PSLM	-1,61±0,49	16,7 <sup>ns</sup>
	PQ	0,27±0,37	56,7*
	PP	-0,13±0,37	46,7*
	MQ	0±0,36	50,0*
	MP	-0,27±0,37	43,3*
<i>M. anisopliae</i> ENTO-25	PSLM	-0,27±0,37	43,3*
	PQ	-0,13±0,37	46,7*
	PP	-0,40±0,37	40,0*
	MQ	-1,01±0,41	26,7 <sup>ns</sup>
	MP	-1,19±0,43	23,3 <sup>ns</sup>
	TESTIGO	-2,64±0,73	6,7
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0.0001</b>			

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Diferencias significativas con el testigo P≤0,05 según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

<sup>ns</sup>Diferencias no significativas con el testigo (P≥0,0528).

En la figura 18 se evidencia la patogenicidad del hongo *M. anisopliae* sobre la cochinilla harinosa, observándose micelio sobre el cadáver del insecto, donde se aplicó propágulos producidos con adición de quitina coloidal (ENTO-24 –PQ).



**Figura 18. Insecto colonizado (micelio) por *M. anisopliae*, producto de la aplicación del tratamiento ENTO-24-PQ.**

En el bioensayo N°5 (Cuadro 19) el testigo mostró un 13,3% de mortalidad de los insectos. Sin embargo, los aislamientos y los tratamientos ENTO-36 –PQ (60%), ENTO-12 –PQ (56,7%) y ENTO-12 –PSLM (56,7%) mostraron los mayores porcentajes de mortalidad de las cochinillas; caso contrario ocurrió con ENTO-34 –MQ (30%), ENTO-12 –MQ (30%) y ENTO-36 –MP (26,7%), los cuales presentaron los menores porcentajes de mortalidad de los insectos.

**Cuadro 19. Bioensayo N°5; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *B. bassiana* (ENTO-12), *M. anisopliae* (ENTO-34 y ENTO-36).**

HONGO	TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD %
<i>B. bassiana</i> ENTO-12	PSLM	0,27±0,37	56,7 <sup>*</sup>
	PQ	0,27±0,37	56,7 <sup>*</sup>
	PP	-0,69±0,39	33,3 <sup>ns</sup>
	MQ	-0,85±0,40	30,0 <sup>ns</sup>
	MP	-0,55±0,38	36,7 <sup>*</sup>
<i>M. anisopliae</i> ENTO-34	PSLM	-0,55±0,38	36,7 <sup>*</sup>
	PQ	0,13±0,37	53,3 <sup>*</sup>
	PP	-0,27±0,37	43,3 <sup>*</sup>
	MQ	-0,85±0,40	30,0 <sup>ns</sup>
	MP	-0,55±0,38	36,7 <sup>*</sup>
<i>M. anisopliae</i> ENTO-36	PSLM	-0,40±0,37	40,0 <sup>*</sup>
	PQ	0,40±0,37	60,0 <sup>*</sup>
	PP	0,13±0,37	53,3 <sup>*</sup>
	MQ	-0,13±0,37	46,7 <sup>*</sup>
	MP	-1,01±0,41	26,7 <sup>ns</sup>
	TESTIGO	-1,87±0,54	13,3
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0,0051</b>			

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Diferencias significativas con el testigo P≤0,05, según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

<sup>ns</sup>Diferencias no significativas con el testigo (P≥0,0751).

En el bioensayo N°6 (Cuadro 20) las mortalidades obtenidas fueron relativamente bajas (entre el 16,7% y 26,7%) pero superiores al testigo (3,3%), con excepción de los



aislamientos y los tratamientos ENTO-33–PQ ( $P \leq 0,0042$ ) y PL-12-PQ ( $P \leq 0,0140$ ), los cuales presentaron las mortalidades más altas de un 44,3% y 33,4% respectivamente.

**Cuadro 20. Bioensayo N°6; Medias de mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados crudos de cultivos, de *B. bassiana* *M. anisopliae* (ENTO-33) y *P. lilacinum* (PI-12).**

HONGO	TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD %
<i>M. anisopliae</i> ENTO-33	PSLM	-1,61±0,49	16,7 <sup>ns</sup>
	PQ	-0,27±0,37	43,3*
	PP	-1,19±0,43	23,3*
	MQ	-1,39±0,46	19,9 <sup>ns</sup>
	MP	-1,01±0,41	26,7*
<i>P. lilacinum</i> PL-12	PSLM	-1,01±0,41	26,7*
	PQ	-0,69±0,39	33,4*
	PP	-1,19±0,43	23,3*
	MQ	-1,39±0,46	19,9 <sup>ns</sup>
	MP	-1,01±0,41	26,7*
	TESTIGO	-3,37±1,02	3,3
<b>Diferencias entre tratamientos, P=0,0460</b>			

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

\*Diferencias significativas con el testigo  $P \leq 0,05$ , según prueba DMS de Wald (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2011).

<sup>ns</sup>No hay diferencias significativas con respecto al testigo ( $P \geq 0,0756$ ).

Los promedios de mortalidad para cada tratamiento (medio inductor) por bioensayo se presentan en el cuadro 21. En los bioensayos N° 2, 3 y 6 no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \geq 0,1124$ ). En el bioensayo N°1 se presentó diferencias significativas entre los medios PQ y PP de 17 puntos porcentuales ( $P=0,0216$ ). En el bioensayo N°4 el tratamiento PQ presentó diferencias significativas con respecto a MP en un 19% ( $P=0,0384$ ) y a PSLM en un 24% ( $P=0,0122$ ). En el bioensayo N°5 se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0,0133$ ), el tratamiento PQ se diferenció significativamente de MP en un 24% ( $P=0,0018$ ) y MQ en un 21% ( $P=0,0045$ ). Por otro lado, en el bioensayo N°6 el tratamiento PQ (38%) se diferenció significativamente de los tratamientos MQ (20%) ( $P=0,0307$ ) y PSLM (21%) ( $P=0,0467$ ). En estos bioensayos N°1, 4 y 5 las otras comparaciones entre tratamientos no mostraron diferencias significativas ( $P \geq 0,05$ ).

**Cuadro 21. Mortalidad promedio de *P. elisae* según medio inductor. Datos según bioensayo.**

MEDIO INDUCTOR	Lógito <sup>2</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD (%)
<b>Bioensayo N°1 (N<sup>3</sup>=450)</b>		
PSLM	-0,55±0,22	37 ab
PQ	-2,08E-16±0,22	50 a
PP	-0,72±0,23	33 b
MQ	-0,18±0,21	45 ab
MP	-0,55±0,22	37 ab
<b>P=0,1124</b>		
<b>Bioensayo N°2 (N=450)</b>		
PSLM	-0,09±0,23	48 a
PQ	-0,33±0,22	42 a
PP	-0,52±0,22	37 a
MQ	-0,62±0,23	35 a
MP	-0,65±0,22	34 a
<b>P=0,3741</b>		
<b>Bioensayo N°3 (N=450)</b>		
PSLM	-0,56±0,22	36 a
PQ	-0,36±0,21	41 a
PP	-0,76±0,23	32 a
MQ	-0,51±0,22	37 a
MP	-0,62±0,22	35 a
<b>P=0,7802</b>		
<b>Bioensayo N°4 (N=300)</b>		
PSLM	-0,94±0,31	28 b
PQ	0,07±0,26	52 a
PP	-0,27±0,26	43 ab
MQ	-0,51±0,28	38 ab
MP	-0,73±0,28	33 b
<b>P=0,0836</b>		
<b>Bioensayo N°5 (N=300)</b>		
PSLM	-0,23±0,22	44 ab
PQ	0,27±0,21	57 a
PP	0,28±0,22	43 ab
MQ	-0,61±0,22	35 b
MP	-0,70±0,22	33 b
<b>P=0,0133</b>		
<b>Bioensayo N°6 (N=450)</b>		
PSLM	-1,31±0,32	21 b
PQ	-0,48±0,27	38 a
PP	-1,19±0,31	23 ab
MQ	-1,39±0,32	20 b
MP	-1,01±0,29	27 ab
<b>P=0,1734</b>		

<sup>1</sup>Tratamiento= Significado de las siglas expuesto en el apartado 4.3.3 (Cuadro 9).

<sup>2</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

<sup>3</sup>N= número de individuos evaluados por bioensayo.

### 5.3.2 Comparación grupal según aislamiento y tratamiento.

Con la excepción del bioensayo 4 ( $P=0,0279$ ), en los demás bioensayos no se encontraron interacción entre los tratamientos y los aislamientos de hongos entomopatógenos ( $P \geq 0,2618$ ); y tampoco al considerar los seis bioensayos en su conjunto ( $P=0,2592$ ), lo cual significa que las diferencias entre hongos no dependen del medio inductor, ni las diferencias entre medios inductores dependen del tipo de hongo.

Al analizar en su conjunto la mortalidad producida por los 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 22). Los aislamientos que mostraron una mayor mortalidad sobre el insecto fueron: ENTO-05 (49,4%), LL-56 (42,1%), ENTO-29 (38,5%) y ENTO-01 (38,3%); difiriendo significativamente de los otros aislamientos.

**Cuadro 22. Medias de mortalidad de cochinillas, tratadas con 16 aislamientos de hongos entomopatógenos (la mortalidad promedio del testigo fue de 5%).**

ESPECIE (AISLAMIENTO)	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	MORTALIDAD (%)
<i>B. bassiana</i> (ENTO-05)	-0,02±0,17	49,4a
<i>L. lecanii</i> (LL-56)	-0,32±0,17	42,1ab
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-29)	-0,47±0,17	38,5ab
<i>B. bassiana</i> (ENTO-01)	-0,47±0,17	38,3ab
<i>M. anisopliae</i> (MA-15)	-0,65±0,17	34,3bc
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-24)	-0,68±0,19	33,5bc
<i>P. lilacinum</i> (PL-11)	-0,69±0,18	33,4bc
<i>B. bassiana</i> (ENTO-03)	0,73±0,18	32,5bc
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-36)	0,82±0,19	30,5cd
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-23)	-0,87±0,18	29,6cd
<i>P. lilacinum</i> (PL-10)	-0,89±0,18	29,0cd
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-25)	-0,93±0,19	28,3cd
<i>B. bassiana</i> (ENTO-12)	-0,94±0,19	28,0cd
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-34)	-1,05±0,19	26,0cd
<i>P. lilacinum</i> (PL-12)	-1,24±0,20	22,4d
<i>M. anisopliae</i> (ENTO-33)	-1,29±0,21	21,5d

<sup>1</sup>Logito= $\text{Log}[p/(1-p)]$ ; p=proporción de cochinillas muertas.

Por otro lado, al comparar en su conjunto los tipos de tratamientos para la producción de propágulos y metabolitos, se presentaron diferencias significativas entre estos ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 23), encontrándose que el mejor tipo de tratamiento utilizado fue el de propágulos producidos con adición de quitina coloidal (PQ), presentando una media de mortalidad sobre los insectos del 41,7%, difiriendo significativamente de los otros medios ( $P < 0,0003$ ).

**Cuadro 23. Medias de mortalidad de *P. elisae*, según tipo de tratamiento (propágulos y filtrados)**

TIPO DE TRATAMIENTO	Lógito <sup>1</sup> ±Err.Est.	PROMEDIO <sup>2</sup>
PQ	-0,33±0,09	41,7a
PSLM	-0,80±0,11	31,0b
PP	-0,84±0,10	30,1b
MQ	-0,85±0,10	30,0b
MP	-0,95±0,10	28,0b

**P<0.0001**

<sup>1</sup>Logito=Log[p/(1-p)]; p=proporción de cochinillas muertas.

<sup>2</sup>Porcentajes de mortalidad promedio alcanzada con la aplicación de propágulos y metabolitos en diferentes medios de cultivo.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de sustratos de naturaleza vegetal, para el mantenimiento de las cochinillas

Teniendo en cuenta que en evaluaciones posteriores se determinó el efecto de diversos hongos sobre el insecto, se seleccionaron los resultados de las evaluaciones al octavo día en las pruebas realizadas en los apartados 5.1 y 5.2.1, en función con diferentes estudios que demuestran que el ciclo de infección de los hongos entomopatógenos en insectos similares a *P. elisae* se da en un periodo entre 7 a 8 días DDA. Como evidencia de esto Pereira (2009), mostró valores de tiempo letal medio (TL50, tiempo promedio transcurrido en los diferentes individuos, desde la aplicación del microorganismo hasta su muerte) aproximado de 8,6 días en insectos adultos de *Pseudococcus viburni* tratados con *M. anisopliae*; Quesada *et al.* (2006), documentaron valores de TL50 de 5,9 hasta 7,4 días en *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* en etapa adulta, tratadas con *B. bassiana* ( $10^7$  conidias/ml); Mendoza *et al.* (2006), obtuvieron valores de mortalidad de *Planococcus citri* tratadas con *L. lecanii* ( $1 \times 10^8$  conidias/ml), de un 90%, al cuarto día DDA. Finalmente, Murcia y Salamanca (2006), aunque trabajando con un tipo diferente de insecto, *Bephratelloides maculicollis* (Hymenoptera: Eurytomidae), reportaron tiempos similares en evaluaciones con *Paecilomyces lilacinus* ( $6,4 \times 10^7$  conidios/ml), mediante el cual se alcanzó el 100% de mortalidad del insecto al cuarto día DDA.

Diferentes estudios (Granara de Willink *et al* 1997, Niebla *et al.* 2010 y Cubillo 2013) señalan a las cochinillas como cosmopolitas y polífagas. En esta investigación se demostró bajo condiciones *in vitro*, una mayor preferencia del insecto hacia frutos de chayote en comparación con el tacaco y el camote, lo cual se evidenció debido a que al octavo y quinceavo día después de la colocación de las cochinillas sobre los frutos y tubérculos, hubo una menor mortalidad de los insectos (5,3% y 44,4%, respectivamente) con respecto a 5,4% y 74,4% de mortalidad presentada en el tacaco y 10,8% y 66,7% en el camote; además, como se observó en la Figura 11 los insectos mostraron una mayor capacidad de colonizar los frutos de chayote y producir progenie (ovisacos), situación que no ocurrió en el tacaco ni el camote.

Lo anterior se asocia a las características de los frutos de chayote, los cuales presentan un exocarpo con presencia de surcos (epicarpio delgado), que le brindan refugio

a los insectos; además presenta un mesocarpo carnososo-suave, formado por un parénquima de almacenamiento rico en nutrientes (Gamboa 2005 y Reyes 2012), que contiene un 90% de agua (Del Pilar 2010, Shiga *et al.* 2015), 22% de azúcares solubles (fructosa y glucosa), 27% polisacáridos solubles, 20% polisacáridos no solubles, 10% de almidón (Shiga *et al.* 2015) y aminoácidos importantes (ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, prolina, serina, tirosina, treonina y valina) los cuales le brindan suavidad a la pulpa del fruto (Siciliano *et al.* 2004).

Aunado a lo anterior, Cubillo (2013), indica que las ninfas y hembras de *P. elisae* poseen un largo estilete que sirve para extraer la savia necesaria para su alimentación. Según Hijaz y Killiny (2014), la savia del floema de los tejidos vegetales, generalmente se compone de altas cantidades de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas e iones inorgánicos. Por lo tanto, el chayote aporta las condiciones morfológicas y los nutrientes necesarios para la alimentación de las cochinillas. Además, MAG (2007) considera al género *Pseudococcus* sp como una de las plagas de mayor impacto en el cultivo del chayote.

A pesar de que el tacaco y el chayote pertenecen a la misma familia taxonómica (cucurbitaceae), los frutos de tacaco presentan diferencias morfológicas a nivel de epicarpio, el cual está constituido por una serie de capas de esclerénquima, y su mesocarpo está formado de parénquima con alto contenido de almidón y una red de fibras (León 2000). Estas características le dan a la epidermis del tacaco una consistencia más dura, por tanto, pueden interferir en la alimentación del insecto.

Por otro lado, los tubérculos de camote a pesar de contener aproximadamente un 70% de agua (Martí *et al.* 2011; Cusumano y Zamudio 2013), presentan un alto contenido de almidón; además, el área comprendida entre el peridermo y el cambium (lacticifer), es ocupada por aproximadamente 5mm de tejido compuesto por parénquima pobre en almidón, y una serie de células ricas en látex, las cuales se hacen más numerosas en la cercanía del cambium; este último cuenta a la vez con una serie de elementos del xilema radialmente ordenados junto con células del parénquima repletas de almidón (Chacón y Reyes 2009). Al igual que el tacaco, tales características morfológicas del fruto del camote, podrían dificultar la adecuada alimentación de las cochinillas.

## **6.2 Eficacia de diferentes agentes dispersantes y su compatibilidad con los hongos entomopatógenos**

La selección de los dispersantes se realizó mediante tres criterios: 1) su capacidad para humectar y penetrar las capas cerosas del insecto; 2) su efecto directo sobre el insecto; y 3) su compatibilidad con los hongos.

En el primer caso se determinó que los dispersantes Traspore® y Limonoil®, no fueron eficaces para humectar la cutícula, a pesar de haber utilizado concentraciones significativamente mayores a las recomendadas por los fabricantes; caso contrario a Break thru® y Cosmo-IN d®, los cuales a concentraciones de 0,06% y 0,8% respectivamente, penetraron y humectaron de forma eficaz la capa cerosa del insecto alcanzando su cutícula.

La respuesta negativa de Limonoil®, coadyuvante donde el componente activo es el D-limoneno (extracto de aceite vegetal), no cumple la función de surfactante, por lo tanto, no mejora la emulsión, dispersión y mojado, a través de la modificación del comportamiento de los líquidos en superficie. De tal modo el comportamiento hidrofóbico de la molécula inhabilita que actúe sobre la capa cerosa de las cochinillas, según King y Akai (2012), Ortiz y Keyhani (2013), dicha cera químicamente se define como ésteres de alcoholes de cadena larga y ácidos grasos; sin embargo las ceras de los insectos son inertes, se acumulan en la superficie del cuerpo donde funcionan para protegerlos ante la desecación y los daños mecánicos; es producida por las células de las glándulas de cera abdominales donde predominan las moléculas de ésteres, y otras sustancias, especialmente los lípidos tales como hidrocarburos y ácidos grasos libres. Las cantidades relativas de cera verdadera son muy variables de una especie a otra (King y Akai, 2012); caracterizándose las cochinillas por su alta producción de cera, lo cual impidió el efecto del coadyuvante.

Por otro lado, en el caso de Traspore® tampoco cumple la función de surfactante, está compuesto de Nonil Fenol Polietoxilado y Glicoles; según Agecom (2012), tienen características no iónicas, la parte hidrofóbica de la molécula proviene del nonilfenol y la parte hidrofílica resulta de la cadena de óxido de eteno, que en función del grado de etoxilación, se obtienen productos de diferentes valores de balance hidrofílico-lipofílico; tal condición pudo interferir en el comportamiento hidrofóbico del dispersante sobre la capa cerosa del insecto.

En el caso de los dispersantes Break thru® y Cosmo-IN d®, compuestos de Poliéter polimetilsiloxano copolímero y Alcohol Etoxilado Polyoxiethylene Alquil Éter, respectivamente, son productos surfactantes que como indica Salager (2002), poseen una actividad superficial o interfacial, donde la molécula tiene propiedades relativamente equilibradas (no es ni demasiado hidrófila ni demasiado hidrófoba); a estos dispersantes seleccionados también se les atribuye las características químicas de surfactantes y tensoactivos (Basfagro 2009, Alfaro 2009, Solano 2011), lo cual les permitió humectar las capas cerosas de las cochinillas.

Con respecto al segundo criterio (efecto directo sobre las cochinillas), se utilizó como variable de medición, a la mortalidad de los insectos luego de 8 días DDA, período vinculado al ciclo de infección de los hongos entomopatógenos (apartado anterior), donde el ciclo es de menos duración, lo que se le atribuye las características de la cutícula de *P. elisae* (poco esclerotizada y con una epicutícula delgada (Pereira 2009)), permitiendo que la penetración del hongo entomopatógeno sobre el insecto sea más fácil y rápida, en comparación a otros insectos como los coleópteros, que presentan cuatro capas superpuestas (Cruz 2006).

Por lo tanto, para la evaluación del tercer criterio, se seleccionó el dispersante Break thru®, el cual mostró el menor porcentaje de mortalidad (6%;  $P > 0,083$ ) de los insectos al octavo día DDA, en comparación con Cosmo-IN d® (13,6%) (Cuadro 10).

Finalmente, con respecto a la compatibilidad con los hongos, se encontró que el dispersante Break thru®, no afectó la germinación de ninguno de los aislamientos evaluados (Cuadro 11), y tampoco provocó deformidades en los tubos germinativos (Figura 15). Según Castiglioni *et al.* (2003), los estudios *in vitro* exponen al máximo al microorganismo a la acción del producto químico, para brindar confiabilidad sobre los resultados de compatibilidad entre ambos. Esta compatibilidad con algunos productos similares, ha sido anteriormente descrita por diferentes autores, como por ejemplo, Kaaya y Hassan 2000; Bastidas *et al.* 2009, con *B. bassiana*; Rodríguez 1999, Bateman y Chapple 2001, con *M. anisopliae*; Cortéz 2006, con *Paecilomyces farinosus* y *L. lecanii*. Aunado a lo anterior, Fernández *et al.* (2002) y Bastidas *et al.* (2009), indican que los dispersantes no interactúan con las esporas, y a través de una formulación se mejora la estabilidad y la vida de almacenamiento de estas. Por lo tanto, al no existir un efecto del dispersante sobre la germinación de los conidios de los hongos entomopatógenos, asegura la eficiencia de los resultados en evaluaciones posteriores.



### **6.3 Mortalidad de las cochinillas tratadas con propágulos y filtrados metabólicos de los hongos entomopatógenos.**

Gandarilla *et al.* (2013), indican que un factor de suma relevancia en la selección de diferentes aislados y/o cepas de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, radica en la elección de un método de bioensayo efectivo que conjunte las condiciones óptimas para el insecto y el desarrollo de los hongos entomopatógenos. En la presente investigación, las unidades experimentales fueron sometidas a una humedad relativa de 92% y a una temperatura promedio de 26,5°C. Estas condiciones según Batista (1998), Acosta (2006), Pucheta *et al.* (2006) y Falconi (2009), se encuentran dentro del rango óptimo para el adecuado desarrollo de los hongos entomopatógenos.

En general, todos los aislamientos utilizados en este estudio causaron cierto grado de mortalidad sobre *P. elisae* (Cuadro 22); la variación entre aislamientos pudo ser producto de diferentes factores, entre estos, la especificidad parasitaria y las necesidades nutricionales de cada aislamiento evaluado (Lecuona 1996, Cazorla *et al.* 2011, Motta *et al.* 2011); la composición de los medios de crecimiento (Ballesteros, 2013) y la producción de metabolitos secundarios, que influyen en la capacidad del patógeno para causar la enfermedad del insecto (Padulla *et al.* 2009 citado por Gandarilla *et al.* 2013).

En el análisis individual de los bioensayos se evidenció que el aislamiento ENTO-05 con el tratamiento PSLM, mostró el mayor porcentaje de mortalidad (73,3%) sobre *P. elisae*; ubicándose el análisis grupal dentro los mejores cuatro aislamientos, presentando un porcentaje de mortalidad promedio del 49,4%. No obstante, este medio inductor (SLM) en comparación con otros incluidos en esta investigación, permitió únicamente al aislamiento ya mencionado y el aislamiento ENTO-12 (ambos pertenecientes a la especie *B. bassiana*), alcanzar niveles de mortalidad de las cochinillas por encima del 50%. Esto vinculado a que en dicha investigación no se encontró interacción tratamiento x aislamiento ( $P \geq 0,2618$ ), no dependiendo las diferencias entre aislamientos (hongos entomopatógenos) de los tratamientos, ni viceversa.

Si bien SLM contiene las fuentes de nitrógeno y carbono necesarias para el desarrollo de estos hongos, el estudio realizado por Ballesteros (2013) utilizando espectrofotometría (multimodo DTX detector 880), lo catalogaron como poco eficaz para incentivar en *B. bassiana*, su capacidad de producción de quitinasas (2,5-3,3 U/ml) y proteasas (6,46 U/ml),

enzimas que según Kuranda y Robbins (1991), participan en los procesos de crecimiento, desarrollo y elongación de las hifas; Por lo tanto, los buenos resultados obtenidos con los aislamientos ENTO-05 y ENTO-12 se pueden deber a las características intrínsecas de los aislamientos de los hongos (ENTO-05 (49,4%), LL-56 (42,1%), ENTO-29 (38,5%) y ENTO-01 (38,3%)) sobre *P. elisae*.

Los mejores cuatro aislamientos en el análisis grupal pertenecen a los géneros *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *L. lecanii* (con porcentajes promedios de mortalidad de los insectos de 49,4% (ENTO-05), 42,1% (LL-56), 38,5% (ENTO-29) y 38,3% (ENTO-01), respectivamente), tales hongos no han sido informados específicamente como controladores biológicos de *P. elisae*., pero si se ha evidenciado su patogenicidad hacia otras especies de insectos pertenecientes a la familia Pseudococcidae; tales son los casos de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *Dysmicoccus brevipes* (Gratereaux 2009, Miranda y Metzler 2013), *Planococcus citri* (Mendoza *et al.* 2006); *M. anisopliae* sobre *Pseudococcus viburni* (Pereira *et al.* 2011) y *L. lecanii* sobre cochinillas en cítricos y *Coccus viridis* en café (Batista 1998).

En el análisis individual de los tratamientos por bioensayo, el tratamiento PQ destinado para la producción de propágulos de naturaleza quitinolítica, estuvo presente en el 55% de los mejores resultados de mortalidad de los insectos y en el análisis grupal obtuvo los más altos porcentajes promedio de mortalidad de las cochinillas (41,7%), en comparación con los otros medios inductores utilizados ( $P < 0,0003$ ). Estudios realizados por Duo-Chuan *et al.* (2005) y Mayorga *et al.* (2012), indican que efectivamente, la adición de quitina coloidal induce en los hongos a una alta producción de quitinasas. Al ser la pared celular de los hongos una estructura reticular compleja compuesta de quitina, glucanos y otros polímeros, la presencia de quitinasas facilita la degradación de la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración del integumento, por presión mecánica iniciado por el apresorio (estructura especializada formada en el tubo germinativo), facilitando la etapa de infección del hongo y adicionalmente importante en la invasión del hemocele del insecto (Franko *et al.* 2011, González *et al.* 2014). Otro factor importante que favorece una mayor actividad quitinolítica en los cultivos fúngicos, es su sometimiento a agitación orbital (Liu *et al.*, 2003) y en este estudio los cultivos fueron sometidos a agitación orbital a 150 RPM.

Los medios inductores utilizados para la producción de propágulos (fermentación sólida) de naturaleza quitinolítica (PQ) y proteolítica (PP) mostraron mayores porcentajes de mortalidad, en comparación con los utilizados para la producción de metabolitos (fermentación líquida). Resultados similares obtuvieron Barranco *et al.* (2002), Matsumoto *et al.* (2004), Rocha (2009), quienes comprueban mediante la técnica de cromatografía y electroforesis, que *L. lecanii* incrementó la producción de quitinasas y proteasas utilizando el tipo de fermentación sólida en comparación con la fermentación líquida. Rocha (2009), justifica tal comportamiento debido que en el medio inductor con sustrato sólido, los microorganismos tienen mayor contacto con el sustrato y existe una mejor difusión de oxígeno, a diferencia del cultivo sumergido (fermentación líquida), donde el crecimiento del micelio incrementa la viscosidad del medio, disminuyendo la difusión del oxígeno, lo que repercute en la asimilación de los nutrientes y por lo tanto, en la excreción de enzimas hidrolíticas.

Por otro lado, el medio inductor para la producción de metabolitos proteolíticos (MP), no mostró buenos resultados (Cuadro 23), tal medio con adición de cutícula de *G. mellonella* (70% de proteína), como lo mencionaron Rocha (2009), Borges *et al.* (2010) y Ballesteros (2013), han demostrado que la presencia de cutícula funciona como un inductor de proteasas; además estudios como Qazi y Khachatourians (2008) demuestran que la presencia de exuvias de *Sitobion avenae* (Hemiptera) en el medio de crecimiento para *B. bassiana*, conduce a la producción de proteasas (Pr1); Murad *et al.* (2006), detectaron mediante electroforesis, que cepas de *M. anisopliae* en medios de crecimiento con adición de cutícula de *Callosobruchus maculatus* induce a la actividad de proteasas. Zibae (2009), evaluó un medio de crecimiento muy similar al utilizado en la presente investigación (con la diferencia de utilizar cutícula de *Eurygaster integriceps* (Hemiptera)), donde mencionó que fuentes como la cutícula,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$  aumentan la actividad de las proteasas, pero el  $\text{ZnCl}_2$  inhibe dicha actividad. Por lo tanto, existe la probabilidad de que la presencia de  $\text{ZnCl}_2$  en el medio PP, intervino en la inhibición de proteasas, afectando los resultados.

Sin embargo, Barranco *et al.* (2002) y Peteira *et al.* (2011), exponen en su estudio que la respuesta de cada cepa de producir enzimas en los diferentes sistemas (fermentación sólida o líquida), depende de su capacidad de adaptación a los medios de crecimiento, notando que ambas actividades enzimáticas (proteasas y quitinasas) deben estar presentes para considerar un aislamiento virulento.

Aunque no existen estudios similares al realizado en la presente investigación, en cuanto a las dosis utilizadas para la aplicación de los propágulos y los filtrados crudos metabólicos se puede denotar, que se utilizó una concentración de propágulos en la aplicación de los tratamientos similar a las empleadas en otros estudios mencionados en el punto 6.2 (Murcia y Salamanca 2006, Mendoza *et al.* 2006, Fan *et al.* 2013), evidenciando que concentraciones que rondan los  $10^7$  conidios/ml, provocan altos porcentajes de mortalidad. Sin embargo, en cuanto a la concentración utilizada para las aplicaciones de los filtrados crudos metabólicos, Fan *et al.* (2013), correlacionaron que a mayores concentraciones de metabolitos (5,5 -550 g/ml) de *B. brongniartii*, mayores son los porcentajes de mortalidad de *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera); por lo tanto, es importante en investigaciones futuras evaluar el efecto de incrementos en la concentración del filtrado crudo metabólico utilizado.

Si bien en el presente trabajo no se realizó una identificación de los compuestos y metabolitos producidos, existen estudios que lo demuestran; por ejemplo Zibae *et al.* (2009), comprobaron la producción de proteasas extracelulares de *B. bassiana* (Pr1 subtilisina, Pr2 tripsina y serin-proteasa), utilizando en su medio inductor, cutícula de *E. integriceps*; Vallejos *et al.* (2014) comprobaron la actividad quitinolítica de *B. bassiana*. También se ha reportado la producción de proteasas por *M. anisopliae* (Téllez *et al.* 2009; Gandarilla *et al.* 2013) y destruxinas (Pucheta *et al.* 2006, Borges *et al.* 2010, Ugalde 2010, García *et al.* 2011). Borges *et al.* (2010) afirmaron que *L. lecanii* produce ácido oxálico, el cual participa en la solubilización de las proteínas cuticulares, y Batista (1998) cita que produce bassianolide, causando parasitismo en poblaciones de cochinillas de cítricos. También se evidencia la producción de ácido dipicolínico, por parte de *Paecilomyces* spp. y *M. anisopliae* (García *et al.* 2011).

## 7. CONCLUSIONES

-El chayote, *Sechium edule*, fue el sustrato vegetal más apto para favorecer una mayor longevidad y producción de progenie a la cochinilla harinosa, *Pseudococcus elisae*, bajo las condiciones experimentales utilizadas.

-Se mostró una menor preferencia de las cochinillas harinosas hacia los sustratos tacaco y camote, así como una menor colonización de los insectos sobre estos.

-El dispersante Break thru® provocó un bajo porcentaje de mortalidad de las cochinillas; asimismo, sus características químicas, le permitieron humectar la capa cerosa del insecto de manera eficiente, asegurando una aplicación efectiva de los tratamientos.

-El dispersante Break thru® no afectó la germinación de los conidios de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. lilacinum* y *L. lecanii.*, mostrándose como un producto altamente compatible con estos hongos.

-Indiferentemente del tratamiento utilizado, los aislamientos que mostraron una mayor mortalidad sobre los insectos, fueron ENTO-05, LL-56, ENTO-29 y ENTO-01, convirtiéndose en aislamientos promisorios para investigaciones futuras.

-El mejor medio inductor utilizado fue PQ (producción de propágulos con inducción de quitinasas); este reportó los mayores porcentajes de mortalidad de los insectos, lo que evidenció que la adición de quitina coloidal aumenta la patogenicidad de los HE sobre las cochinillas.

-La utilización de medios inductores con la adición de quitina coloidal, es una potencial alternativa al uso del tradicional del medio SLM.

-El empleo de cutícula de *G. mellonella* en los medios inductores sólidos (PP) y líquidos (MP), utilizados para la inducción de proteasas, mostraron resultados regulares, tales no se diferenciaron estadísticamente del medio tradicional SLM.

-Las aplicaciones de propágulos fueron mejores en comparación con los filtrados crudos metabólicos, evidenciando su gran potencial en el control de las cochinillas harinosas.

-La presente investigación se ha convertido en el primer estudio enfocado en el desarrollo de una metodología práctica y eficaz, para la evaluación de la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Pseudococcus elisae*, ampliando las posibilidades de encontrar candidatos de alto potencial para el control biológico del insecto.

## 8. RECOMENDACIONES

-Evaluar la agresividad de los aislamientos más promisorios sobre las cochinillas harinosas, y a su vez encontrar un mejor sustrato, que le permita el mantenimiento del insecto por un tiempo más prolongado.

-Realizar algunas modificaciones en la composición del medio inductor líquido de naturaleza proteolítica (MP), por ejemplo, eliminar el  $ZnCl_2$ , ya que este inhibe la actividad de las proteasas, y utilizar cutícula de otros insectos, lo cual podría aumentar la actividad de estas.

-Evaluar el posible efecto sinérgico al mezclar los mejores aislamientos y combinaciones de los medios inductores, que busquen tanto la inducción de proteasas como quitinasas, con la hipótesis de incrementar los porcentajes de mortalidad de los insectos.

-Analizar el efecto de diferentes concentraciones de propágulos y filtrados metabólicos crudos de los aislamientos promisorios, sobre la mortalidad de las cochinillas.

-Incluir estudios bioquímicos que permitan identificar el tipo de enzimas líticas y determinar su producción en función del microorganismo y el medio inductor. Esto permitirá identificar con mayor exactitud, los tratamientos más promisorios y acelerar el proceso de desarrollo de productos biológicos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, J. 2006. Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata*. Tesis. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá D.C, CO. 79p.

Agecom. 2012. Nonilfenol etoxilado 40/60/95. Consultado 05/09/2015. Disponible en: <http://www.agecom.com.br/productos/quimica/sustancias-y-preparados-quimicos/nonilfenol-etoxilado-406095>

Agrocosta. 2012. Ficha técnica: Limonoil® 15 SL. Consultado el: 07/01/2015. Disponible en: [www.agrocosta.net](http://www.agrocosta.net)

Alean, I., A. Morales, C.; A. Bellotti. 2004. Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Revista Colombiana de Entomología. 30 (1): 29-36.

Alfaro, R. 2009. Avances en el control químico de *Rottboellia cochinchinensis* en el cultivo de la Caña de Azúcar en Costa Rica. DIECA. CR. 32p.

Amador, M.; Molina, D.; Guillen, C.; Parajeles, E.; Jiménez, K.; Uribe, L. 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. Agronomía Costarricense 39(3): 47-60.

Apezteguía, A.; Morales, C. 2003. Evaluación de bolsas protectoras del fruto del banano en cultivar Gran Enano. Tesis. EARTH. Guácimo, CR. 33p.

Arana, E. 2011. Análisis de producción del plaguicida biológico *Metarhizium anisopliae*. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. 132p.



Ardilo, Y. 2013. Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora (*Rubus glaucus* Benth.). Tesis Magister. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, CO. 109p.

Arias, P.; Dankers, C.; Liu, P.; Pilkauskas, P. 2004. La economía mundial del banana 1985-2002. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, IT. 98p.

Armijos, J. 2008. Principales tecnologías generadas para el manejo del cultivo de banano, plátano y otras musáceas. Boletín Técnico N° 131. Quito, EC. 64p.

Assaf, A. 2006. Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, MX. 109p.

Ballesteros, J. 2013. Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra *Periplaneta americana* L. y la repuesta inmune del insecto. Tesis M.Sc.. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, MX. 55pp.

Barranco, J.; Alatorre, R.; Gutiérrez, M.; Viniegra, G.; Saucedo, G. 2002. Criteria for the selection of isolates of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii*. Enzyme Microbiology Technology 30(10): 910-915.

Basfagro. 2009. Break thru®. Manual de portafolio de cultivos vegetales. 2p.

Bastidas, A.; Velásquez, E.; Marín, P.; Benavides, P.; Bustillo, A.; Orozco, F. 2009. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (bálsamo) *vuillemin*, para el control de la broca del café. Revista Agronomía.CO. 17(1): 44-61.

Batista, S. 1998. Controle microbiano de insectos. FEALQ. 2da Edición. Piracicaba, BR.1163p.

Bateman, R.; Chapple, A. 2001. The spray application of mycopesticide formulations. CABI Publishing. New York. 289-309pp.

Borges, D.; Díaz, A.; San Juan, A.; Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos (en línea). Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal 44(3): 49-55.

Carr, C. 2009. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano (Musa AAA) para el combate biológico de la Sigatoka negra. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tesis licenciatura. 106p.

Castellanos, J. 2012. Efecto de la actividad metabólica de cepas de hongos antagonistas sobre *Alternaria alternata* (fr.) Causante de la mancha parda en cítricos. Tesis Profesional Biólogo. Lima, PE. 54p.

Castiglioni, E.; Djair, J.; Batista, S. 2003. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con Nimkol-L® para el combate de *Heterotermes tenuis*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 69: 38-44.

Castrillón, C. 2003. Situación actual del picudo negro del banano (*Cosmopolites sordidus* Germar) (Coleoptera: Curculionidae) en el mundo. Actas del Taller "Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas", celebrado en Guayaquil, EC. p. 125-138.

Castro, E.; Rodríguez, A.; Guillén, C. 2010. Evaluación in vitro de diferentes hongos entomopatógenos y sus metabolitos secundarios, para el control biológico de la cochinilla del banano, *Pseudococcus elisae* (HEM:Pseudococcidae). En: Informe de Labores año 2010. Dirección de Investigaciones. Corporación Bananera Nacional (CORBANA). Ed. J. Sandoval. Pp. 95-99.

Cazorla, D.; Morales, P. 2011. Estudio histopatológico y ultraestructural de la infección de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae). Boletín de Malariología y Salud Ambiental 2(1): 71-79.

Chacón, A.; Reyes, Y. 2009. Efecto del empaque sobre la textura y el color del camote (*Ipomoea batatas* L.) durante el proceso de “curado”. Agronomía Mesoamericana 20(1): 47-57.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2009. Protocolo para el manejo fitosanitario y nutricional del banano sometido a un sistema de buenas prácticas agrícolas (BPA). Proyecto Reduciendo el Ecurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe (CEP/UNEP/REPCar). Proyecto demostrativo con BPA en el cultivo del banano (CORBANA). Limón, CR. 31p.

CORBANA. 2016. Estadísticas bananeras: Exportación bananera. San José, Costa Rica. Consultado el: 19/03/2016. Disponible en: [http://www.corbana.co.cr/categories/categoria\\_1344368863](http://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1344368863)

Cortéz, H. 2006. Efecto de coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. Revista Mexicana de Fitopatología 24(1): 59-64.

Coto, D.; Saunders, J. 2004. Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en los frutales de América Central. CATIE. Turrialba, Cartago, CR. 420 p

Cruz, J. 2006. Entomología: morfología y fisiología de los insectos. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, CO. 220pp.

Cubillo, D. 2013. Manejo integrado de insectos plagas en el cultivo de banano. Grupo Diseños Impresos. San José, CR. 116p.

Cubillo, D.; Laprade, S. 2005. Las cochinillas harinosas (Homoptera: Pseudococcidae) asociadas al cultivo del banano (*Musa AAA*): Especies y su daño. In Informe anual 2005. CORBANA. Dirección de Investigaciones y Servicios Técnicos. San José, CR. p. 141-143.

Culik, M.; Martins D.; Gillan P. 2006. First records of two mealybug species in Brazil and new potential pests of papaya and coffee. *Journal of Insect Science* 6(23):6.

Cusumano, C.; Zamudio, N. 2013. Manual técnico para el cultivo de batata (Camote o Boniato) en la provincia de Tucumán (Argentina). Ediciones INTA. Tucumán, AR. 48p.

Del Pilar, A. 2010. *Sechium edule* (jacq.) Swartz y los fitoesteroles como agentes antihiperlipidémicos y antihipertensivos. *Revista Waxapa* 3: 12.

Duo-Chuan, L.I.; Cheng, S.; Jing, L.U. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159: 223-229.

Espinoza, W. 2010. Transmisión biológica del Virus del Estriado del Banano (BSV) con cuatro especies de piojos harinosos de banano y plátano. Tesis de Grado. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, EC. 59p.

Falconi, F. 2009. Evaluación *in vitro* de hongos entomopatógenos como agentes potenciales para el control de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville 1831 (Hemiptera: Pirkocoridae) plaga del cultivo del algodón. Tesis Profesional Biólogo. Lima, PE. 54p.

Fan, J.; Xie, Y.; Xue, J.; Liu, R. 2013. The effect of *Beauveria brongniartii* and its secondary metabolites on the detoxification enzymes of the Pine Caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis*. *Journal of Insect Science* 13(44): 13.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2004. La economía mundial del banano: 1985-2002. Consultado el: 07/04/2014. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5102s.pdf>

Ortiz, A.; Keyhani, N. 2013. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the Insect Cuticle. *Insects* 4: 357-374.

Fernández, C.; Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?. *Revista Phytoma* 141:14-19.

Franko, K.; Rodriguez, S.; Cervantes, J.; Barranco, J. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Revista Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 11(22): 143-160.

Gamboa, W. 2005. Producción agroecológica una opción para el desarrollo del cultivo del chayote (*Sequium edule* (Jacq.) Sw.). San José, C.R. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 219p.

Gandarilla, F.; López, J.; Galán, L.; Quintero, I. 2013. Patogenicity of native entomopathogenic fungi from the Mexican Citrus- Growing Area against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist* 38(2): 325-338.

García, I.; Amaya, I.; Gallegos, G.; Rodriguez, R.; Aguilar, N. 2011. Análisis de hidrolasas de *Metarhizium anisopliae* en cultivo sólido sobre espuma de poliuretano como soporte. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 3(5): 71-78.

González, I.; Arias, Y.; Infante, D.; Martínez, B.; Peteira, B. 2014. Inducción de enzimas hidrolíticas en una cepa de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams en medio líquido. *Revista Protección Vegetal* 29(2): 137-140.

Granara de Willink, M.; Scatoni, S.; Terra, A.; Frioni, M. 1997. Cochinillas harinosas (Homoptera, Pseudococcidae) que afectan plantas cultivadas y silvestres en Uruguay. *Agrociencia* 1(1): 96-100.

Gratereaux, W. 2009. Potencial del uso de hongos entomopatógenos para el control de cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en producción orgánica de piña (*Ananas comosus*). Tesis para optar por el grado de Maestría en Agricultura Ecológica. Turrialba, C.R. 66p.

Guillén, C.; Rodríguez A.; Laprade S.; Valle H.; Segura R.; Uva V.; Sandoval J. 2010. Biología y control de las cochinillas y escamas que atacan al banano. Hoja divulgativa N° 5, CR. 2p.

Hijaz, F.; Killiny, N. 2014. Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (Sweet Orange). PLOS ONE. V. 9. N° 7. 11pp.

Herrero, N. 2011. Micovirus asociados a los hongos endofíticos y entomopatógenos *Tolypocladium cylindrosporum* y *Beauveria bassiana*. Tesis Doctorado. Universidad de Salamanca, ES. 167p.

IMA (International Mycological Association). 2016. Search on: Mycobank. Consultado el: 10/02/2017. Disponible en: [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)

INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). 2004. Ciclo de vida de los piojos harinosos (cochinillas harinosas) del banano y plátano en Ecuador. Boletín Divulgativo N°390. Quito, EC. 10p.

Jiménez, J. 1992. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plagas. En control microbiano de insectos. Centro de Investigaciones en Palma de Aceite-CENIPALMA. Editorial Kimpres Ltda. Bogotá, CO. 115p.

Kapranas, A.; Tena, A. 2015. Encyrtid parasitoids of soft scale insects: biology, behavior, and their use in biological control. Annual Review of Entomology. 60: 195-211.

Kaaya, G.; Hassan, S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Experimental and Applied Acarology 24: 913-926.

King, R.; Akai, H. 2012. Insect ultrastructure. V.2. Plenum Press, New York, USA. 602pp. Consultado el 05/09/2015. Disponible en [https://books.google.co.cr/books?id=KhXIBwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=KhXIBwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Kuranda, M.; Robbins, P. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry 266(29): 19758-19767.

Lecuona, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, AR. 338p.

Leger, R.; Goettel, M.; Roberts, D.; Staples, R. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. Journal of invertebrate pathology 58: 168-179.

León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial Agroamérica del IICA. 3ª Edición. San José, C.R. 522p.

Liu, B.; Kao, P.; Tzeng, Y.; Feng, K. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. Enzyme Microbiology Technology 4(33): 410-415.

Manzo, G.; Orozco, M.; Martínez, L.; Garrido, E.; Canto, B. 2014. Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. Rev. Mex. Fitopatol. 2(32):

Martí, H.; Corbino, G.; Chludil, H. 2011. La batata: el redescubrimiento de un cultivo. Revista Ciencia Hoy 2(121): 17-23.

Matsumoto, Y.; Saucedo, G.; Revah, S.; Shirai, K. 2004. Production of beta-N acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. Process Biochemistry 39(6): 665-671.

Mayorga, L.; Calderón, E.; Gutierrez, A.; González, R.; Azaola, A.; Barranco, E. 2012. Characterization and expression of the chitinasechit II gene from *Lecanicillium lecanii* in solid-state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(1): 97-104.

Mendoza, M.; Alatorre, R.; Hernández, F.; González, H.; Nava, C. 2006. Suceptibilidad del piojo harinoso, *Planococcus citri* (Risso, 1993) (Hemiptera: Pseudococcidae) a productos micoinsecticidas. *Entomotropica. Sociedad Venezolana de Entomología* 21(3): 171-179.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), CR. 2007. Agrocadena chayote. San José, CR. Consultado 6 ago. 2015. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00078.pdf>

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), CR. 2015. Ficha técnica: Para el manejo de *Pseudococcus elisae* y *Diaspis boisdulli*. Consultado 20 nov. 2015. Disponible en [https://www.sfe.go.cr/intranet/documentos/planes\\_de\\_accion/Guia\\_Tecnica\\_Cochinilla\\_en\\_banano.pdf](https://www.sfe.go.cr/intranet/documentos/planes_de_accion/Guia_Tecnica_Cochinilla_en_banano.pdf)

Miranda, A.; Metzler, H. 2013. Control de *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), en el fruto de piña, San Carlos, Costa Rica. *Agronomía costarricense* 37 (1): 103-11.

Motta, P.; Murcia, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente-Agua* 6(2): 77-90.

Murad, A.; Laumann, R.; Lima, T.; Sarmiento, R.; Noronha, E.; Rocha, T.; Valadares, M.; Franco, O. 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142: 365-370.



Murcia, D.; Salamanca, M. 2006. Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de *Bephratelloides maculicollis* plaga de *Annona muricata* L. en algunos cultivos de los departamentos de Tolima y Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota D.C, CO. 79pp.

Muñoz, E. 2014. Mercado global del banano. Centro de Aprovechamiento de Acuerdos Comerciales. Consultado el: 21/07/2016. Disponible en: [file:///D:/Users/PRDR/Downloads/MERCADO\\_GLOBAL\\_DEL\\_BANANO\\_\\_24\\_JUL\\_2014.pdf](file:///D:/Users/PRDR/Downloads/MERCADO_GLOBAL_DEL_BANANO__24_JUL_2014.pdf)

Nicholls, C. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquía. Medellin, CO. 294pp.

Niebla, S.; Jiménez R.; Castellanos L.; Suárez E. 2010. Pseudocóccidos en la provincia de Cienfuegos y sus hospedantes. *Fitosanidad* 14(1): 10.

Orellana, A. 2007. Descripción de las plagas del cultivo del banano de 1995 al 2002 en las fincas de Cobigua en el distrito de Entre Ríos, Municipio de Puerto Barrios, Izabal. Tesis: Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Consultado el: 19/03/2014. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_1485.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_1485.pdf)

Orlando, H.; Flores, R. 2003. Efecto de las condiciones de drenaje sobre el comportamiento y producción de banano (*Musa* spp.). Tesis: Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Limón, CR. 60pp.

Oyarzún, M. 2004. Taxonomía y observaciones biológicas del chanchito blanco de Los frutales, *Pseudococcus viburni* (Signoret). (Hemíptera: Pseudococcidae). Universidad de Chile. Santiago, CL. 84p.

Padulla, LFL.; Alves, SB. 2009. Suscetibilidad de ninfas de *Diaphorina citri* a hongos entomopatogenicos. *Arquivos do Instituto Biologico, São Paulo, BR.* 76: 297-302.

Pariona, N. 2006. Evaluación de la capacidad entomocida de *Beuveria* sp. Sobre *Schistocerca piceifrons* peruviana (Lynch arribalzaga, 1903) nativos del departamento de Ayacucho. Tesis. Consultado el: 26/02/2014. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1395/1/pariona\\_mn.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1395/1/pariona_mn.pdf)

Pereira, A. 2009. Efecto de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (Metsch) Sorokin en la fertilidad, fecundidad, y longevidad de *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae). Universidad de Concepción. Chillán, CL. 30p.

Peteira, B.; González, I.; Arias, Y.; Fernández, A.; Miranda, I.; Martínez, B. 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beuveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Revista Protección Vegetal 26(1): 16-22.

Portal frutícola. 2013. Acercamiento a las problemáticas del cultivo del banano. Santiago, CL. Consultado el: 10/09/2013. Disponible en: <http://www.portalfruticola.com/2013/07/23/acercamiento-a-las-problematicas-del-cultivo-del-banano/?pais=guatemala>

Pucheta, M.; Flores, A.; Rodríguez, S.; De la Torre, M. 2006. Interciencia (INCI). V. 31. N° 12. Consultado el: 26/09/2013. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006001200006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006001200006&script=sci_arttext)

Qazi, S.; Khachatourians, G. 2008. Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beuveria bassiana*. Springer: Archives of Microbiology 189(6): 589-596.

Quesada, E.; Maranhao, E.; García, P.; Álvarez, C. 2006. Selection of *Beuveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis requirements, and toxicogenic activity. Biological control 36 (3): 274-287.

Ramos, A.; Serna, F. 2004. Coccoidea de Colombia, con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, CO. 25p.

Reyes, E. 2012. Estudio del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Tesis Licenciatura. Universidad Veracruzana. MX. 34p.

Ripa, R.; Larral, P.; Luppichini, P.; Guajardo, J.; Rojas, S. 2009. Chanchito blanco de cola larga. Manejo de Plagas en Paltos y Cítricos. 180p. Consultado el: 10/08/2015. Disponible en: [http://www.avocadosource.com/books/Ripa2008/Ripa\\_Chapter\\_08g.pdf](http://www.avocadosource.com/books/Ripa2008/Ripa_Chapter_08g.pdf)

Rocha, Z. 2009. Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivos líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F., MX. 81p.

Rodríguez, A. 1999. Eficiencia y seguridad de tres productos coadyuvantes utilizados en la preparación de mezclas con *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. San José, C.R. 146p.

Rodríguez, A. 2014. Preselección de la alta patogenicidad de cepas de hongos entomopatógenos hacia *Galleria mellonella* (LEP: Pyralidae) a nivel de laboratorio (Entrevista). Limón, CR. CORBANA. (E-mail: [alrodriguez@CORBANA.CO.CR](mailto:alrodriguez@CORBANA.CO.CR))

Sagal. Sf. Química Sagal: Traspore. Monterrey, México. Consultado el: 07/01/2015. Disponible en: [www.quimicasagal.com](http://www.quimicasagal.com)

Salager, J. 2002. Surfactantes: tipos y usos. Universidad de los Andes, VE. Cuaderno FIRP N°300. 53pp.

Sandoval, J. 2009. El banco de germoplasma de la Corporación Bananera Nacional: Una fuente valiosa de genes. Hoja Divulgativa N°1. 2p.

SAS Institute Inc. 2011. Base SAS® 9.3 Procedure Guide. Cary, NC. USA.

Sazo, L.; Araya, J.; De la Cerda, J. 2008. Efecto del coadyuvante siliconado e insecticidas en el control del chanchito blanco de la vid, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). Ciencia e Investigación Agraria 35(2): 215-222.

Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). 2013. Comunicado de prensa: SFE declara emergencia fitosanitaria por plagas en banano. Publicado el: 10/10/2013. Consultado el: 19/03/2014. Disponible en: [https://www.sfe.go.cr/quienes\\_somos/normativa/leyes%20y%20decretos/Decreto\\_38008.pdf](https://www.sfe.go.cr/quienes_somos/normativa/leyes%20y%20decretos/Decreto_38008.pdf)

SFE (Servicio Fitosanitario del Estado). 2015. Guía técnica para el monitoreo de *Pseudococcus elisae* y *Diaspis boisduilli* en Musa AAA. Consultado el: 22/07/2016. Disponible en: [https://app.sfe.go.cr/intranet/documentos/planes\\_de\\_accion/Guia\\_Tecnica\\_Cochinilla\\_en\\_banano.pdf](https://app.sfe.go.cr/intranet/documentos/planes_de_accion/Guia_Tecnica_Cochinilla_en_banano.pdf)

Shiga, T.; Peroni-Okita, F.; Carpita, N.; Lajolo, M.; Cordenunsi, B. 2015. Polysaccharide composition of raw and cooked chayote (*Sechium edule* Sw.) fruits and tuberous roots. Elsevier Ltd. 30: 155-165.

Siliciano, T.; De Tommas, N. Morelli, I.; Braca, A. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Universita di Pisa, IT. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52(21): 6510-6515.

Silva, A. 2005. Impacto de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Deuteromycete: Moniliales) sobre *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) y *Amitus fuscipennis* (Hymenoptera: Platygasteridae), parasitoides de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Trabajo de Grado para optar por el título biólogo. 106p.

Solano, A. 2011. Validación y comparación de un programa de manejo no convencional para el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa*) con el sistema de producción en campo abierto e hidropónico. Tesis. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 68pp.

Suárez, A. 1999. I Curso internacional de riesgos fitosanitarios para la agricultura colombiana. Importancia de la cochinilla rosada *Maconellicoccus hirsutus*, una plaga que amenaza la región. Santa Fe de Bogotá. CO. Consultado el 26/ 09/2013. Disponible en: <http://books.google.co.cr/books>.

Suárez, H. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) plaga de maíz almacenado. Revista Intropica. V. 4. Santa Marta, CO. p.47-53.

Téllez, A.; Cruz, M.; Mercado, Y.; Asaff, A.; Arana, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Revista Mexicana de Micología 30: 73-80.

Ugalde, R. 2010. Evaluación a nivel de campo de la patogenicidad de microorganismos benéficos sobre poblaciones de cochinilla harinosa *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), en el periodo posterior a la inducción floral del cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr), en Finca Indaco Horquetas S.A.. Tesis Licenciatura. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 72p.

Uribe, P. 2003. Curso internacional teórico práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café. CENICAFE (Centro Nacional de Investigación del Café). Bogotá, CO. 112-140p.

Valerio, R.; Lindorf, H.; De García, E. 2002. Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). Agronomía Tropical 52(4): 507-521.

Vallejos, J.; Espinal, C.; Mollinedo, P.; Terrazas, E. 2014. Evaluación de actividad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma inhatum* y *Beauveria bassiana* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *Bolivian Journal of Chemistry* 31(3): 5-9.

Vargas, A.; Cubillo D. 2010. Evaluación de dos modalidades de manejo del pseudotallo después de la cosecha sobre el crecimiento, producción y sanidad de plantas de banano (*Musa AAA*). *Agronomía Costarricense* 34(2): 287-297.

Vargas, A.; Valle H. 2011. Efecto de dos tipos de fundas sobre el fruto de banano (*Musa AAA*). *Agronomía Mesoamericana* 22(1): 81-89.

Villalobos, K. 2012. Evaluación de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* en condiciones de campo para el combate de trips (Hexápoda: Thysanóptera) en el cultivo de aguacate en San Pablo de León Cortés, Costa Rica. Tesis. Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional. 64p.

Villalobos, R. 2011. Efecto de las características y composición de las fundas para racimos de banano sobre las variables de producción, la severidad del Speckling y la incidencia de otras plagas y daños del fruto del banano (*Musa AAA*, CV. Grande Naine). Tesis. San Carlos, Costa Rica. Instituto tecnológico de Costa Rica. 126p.

Walforth, H.; Villegas, C.; Marín, P. 2010. Evaluación en laboratorio de hongos entomopatógenos para el control de *Antiteuchus* sp., (Hemiptera: Pentatomidae) plaga de la macadamia. CENICAFE. 16pp.

Williams, D; Granara, C. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB Internacional, London, UK. p. 54-609.

Zibae, A.; Bandani A. 2009. Purification and characterization of the cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in the presence of Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). *Biocontrol Science and Technology* 19(8): 797-808.

## ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo utilizado para procesar la cutícula de *Galleria mellonella*.

Las larvas congeladas de *G. mellonella*, se licuaron por 1 minuto, posteriormente se realizaron lavados con solución salina (6 Molar), la solución se pasó varias veces por un tamiz (0,5 micras) con el fin de separar la cutícula, tales lavados fueron consecutivos hasta lograr eliminar la presencia de intestinos y grasas. Luego a la cutícula se le realizaron seis lavados con agua destilada, con el propósito de eliminar la sal. Cuando se obtuvo la cutícula, se liofilizó (Liofilizadora LABCONCO) por un tiempo de 16 horas (Figura 19), y por último se maceró, hasta conseguir un polvo fino, el cual se almacenó en un recipiente hermético.



Figura 19. Liofilización de la cutícula y su presentación final.

## **Anexo 2. Prueba para determinar la pureza y viabilidad de los conidios.**

Para la prueba de pureza primero se procedió a realizar series decimales de dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), para cada cultivo se trasladó un 1 ml de la solución madre a un tubo de ensayo estéril con 9 ml de agua destilada; de esta manera se hizo la primera dilución ( $10^{-1}$ ); el tubo que contenía la primera dilución se agitó hasta homogenizar el contenido, luego se tomó una alícuota de 1 ml y se depositó en un segundo tubo de ensayo ( $10^{-2}$ ) con la misma cantidad de agua destilada estéril (9 ml), dicha dilución se agitó durante 30 segundos; posteriormente por medio de una micropipeta se tomó una alícuota 1  $\mu$ L de la solución ( $10^{-2}$ ) y se inoculó en platos petri con PDA acidificado (pH 4,8) para favorecer el crecimiento de hongos, y con agar nutriente para determinar la presencia de bacterias contaminantes; finalmente cuatro días después de realizada la prueba, se revisaron los platos inoculados para verificar su pureza.

Para la prueba de viabilidad, se realizó el mismo procedimiento anterior, con la única diferencia de que solo se inocularon cuatro platos Petri con agar nutriente, 16 horas después mediante la utilización de un estereoscopio se contabilizaron 100 conidios (germinados y no germinados), con el fin de obtener el porcentaje germinación.



### **Anexo 3. Metodología utilizada para la evaluación de la concentración de conidios.**

Se tomó una muestra aproximadamente de 10 gramos del hongo cultivado en arroz esto con el fin de realizar la solución madre, se depositó la muestra del hongo en un beaker con 100 ml de agua destilada estéril, se adicionó una gota del dispersante Tween 20, y se agitó durante un minuto. Posteriormente se tomó 1 ml de la suspensión y se adicionó en tubos de ensayo con 9 ml destilada estéril (dilución  $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta que se preparó la dilución apropiada que permitió el conteo de conidios (Uribe, 2003).

Una vez realizado la dilución se realizó el conteo de conidios con un hematocimetro o cámara de Neubauer. Al tubo de ensayo con la dilución apropiada de la muestra, se le hizo un conteo de conidios, para lo que se agitó en un vortex durante 30 segundos, luego se tomó una muestra de 22  $\mu$ l con una micropipeta, el contenido se depositó en la cámara de conteo (Uribe, 2013). El número de esporas que se contó fueron las que se encontraron en los cuadrantes ubicados en cada esquina y del cuadrante central de cada retículo en que se divide la cámara. La concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas que se obtuvo en el inverso de la dilución empleada para el conteo, por el inverso del factor de la cámara dividido entre los gramos de la muestra, según la fórmula:

$$\text{Concentración de conidios} = \frac{\text{Promedio número de esporas} \times \text{Dilución empleada}^{-1} \times \text{Factor de cámara} \times \text{VSM}^a}{\text{Gr Muestra}}$$

**Gr Muestra**

<sup>a</sup>Volumen de la solución madre

**Fuente: Uribe, 2003**

**Anexo 4. Metodología planteada para evaluar el efecto de propágulos y metabolitos secundarios de 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, sobre la cochinilla harinosa *Pseudococcus elisae*, bajo condiciones de laboratorio.**

1. Activar los hongos entomopatógenos mediante su transferencia a platos Petri con PDA e incubarlos a 25°C en condiciones de oscuridad durante 7 días hasta observar colonias puras y esporuladas.
2. Preparar una solución madre de 250 ml para cada medio líquido inductor (MLI): Saboraud Liquid Medium, medio con adición de quitina coloidal o cutícula de *G. mellonella* (composiciones descritas en los cuadros 6, 7 y 8), posteriormente esterilizarlos a 121°C durante 15 minutos.
3. Verter 125 ml del MLI en erlenmeyers de 250 ml de capacidad (estériles y cubiertos con papel aluminio) y depositar en este, la cuarta parte del hongo activado (punto 1).
4. Utilizar 125 ml de la solución madre para la producción de propágulos y los otros 125 ml para la producción de metabolitos secundarios.
  - 4.1 Para la producción y obtención de propágulos se realiza lo siguiente:
    - 4.1.1 Colocar el erlenmeyer con el MLI más el HE en agitación orbital a 120 RPM, a 24°C por un periodo de 7 días.
    - 4.1.2 Realizar al cuarto día después de agitación una prueba de calidad al medio líquido.
    - 4.1.3 Posterior al periodo de agitación, se toman 20 ml de la biomasa producida en el MLI y se depositan en bolsas conteniendo un sustrato sólido (arroz + granza + agua destilada; relación 2:1).
    - 4.1.4 Poner el material inoculado en incubación en estantes metálicos dentro de salas a 25°C por un periodo de 12 días; determinar al décimo día la viabilidad y pureza según la metodología descrita en el Anexo 2.
  - 4.2 Para la producción y obtención de metabolitos se realiza lo siguiente:
    - 4.2.1 Colocar el erlenmeyer con el MLI más el HE en agitación orbital a 120 RPM, a 24°C por un periodo de 4 días.
    - 4.2.2 Posterior al periodo de agitación, los erlenmeyer se colocan en una incubadora (26°C), donde se deben mantener estáticos durante 10 días en condiciones de oscuridad.

- 4.2.3 Realizar la prueba de calidad al medio líquido, el séptimo día después de realizar el MCI + HE.
  - 4.2.4 Centrifugar a 3000 RPM durante 10 minutos la biomasa obtenida (MCI + HE) al finalizar el periodo de incubación.
  - 4.2.5 Filtrar el líquido sobrenadante utilizando una bomba al vacío y filtros de nitrocelulosa de 4,7 cm de diámetro y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro.
  - 4.2.6 Almacenar el filtrado en un tubo cónico con tapa de rosca, y en condiciones de oscuridad a 3°C.
- 5 Para la aplicación de los tratamientos se realiza lo siguiente:
- 5.1 Depositar los gramos del sustrato sólido con el HE necesarios a disolver en 500 ml de agua estéril con 0,05% de Tween 80, para alcanzar una concentración de  $5,0 \times 10^7$  conidios (100% viables)/ml.
  - 5.2 Preparar una solución al 5% (v/v) del filtrado puro de metabolitos en 250 ml de agua estéril.
6. Lavar, escurrir y secar los frutos de chayote, para posteriormente colocarlos diez minutos en la cámara de flujo laminar con la luz germicida (ultravioleta  $\lambda_{540\text{nm}}$ ).
7. Colocar sobre cada chayote 5 cochinillas adultas.
8. Aplicar a cada insecto 1,0  $\mu\text{l}$  de la suspensión de los tratamientos respectivos (punto 5.1 y 5.2) con la ayuda de una microjeringa.
9. Posteriormente se sitúa el vegetal con las cochinillas dentro de un recipiente y se tapa con papel aluminio con pequeñas perforaciones.
10. Colocar los recipientes en estantes metálicos, en una sala a temperatura ambiente (aprox. 27°C).
11. Evaluar la mortalidad de los insectos al octavo día después de la aplicación de los tratamientos, con ayuda de un estereoscopio, y considerar a un insecto muerto, cuando al voltearlo, no se observe ningún tipo de movimiento por un espacio de 15 segundos.