

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE ONCE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium anisopliae*
(Metsch) Sor. SOBRE GUSANO ALAMBRE *Dipropus* spp. (COLEOPTERA: ELATERIDAE) BAJO
CONDICIONES DE LABORATORIO

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

MARCO ROBERTO CANCINO AVALOS

En el acto de investidura como
INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

Guatemala, marzo de 2006.

DL
01
T(2253)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Dr. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO

Dr. Ariel Abderramán Ortíz López

VOCAL PRIMERO

Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel

VOCAL SEGUNDO

Ing. Agr. Walter Arnaldo Reyes Sanabria

VOCAL TERCERO

Ing. Agr. Danilo Ernesto Dardón Ávila

VOCAL CUARTO

M.E.P.V. Elmer Antonio Álvarez Castillo

VOCAL QUINTO

P.M.P. Miriam Eugenia Espinoza Padilla

SECRETARIO

Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes

Guatemala, marzo de 2006.

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

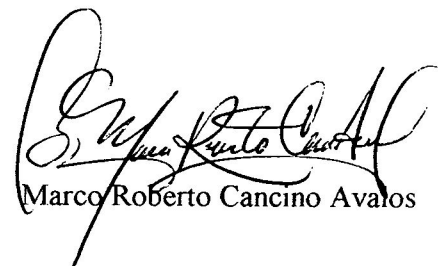
Señores Miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE ONCE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium anisopliae*
(Metsch) Sor. SOBRE GUSANO ALAMBRE *Dipropus* spp. (COLEOPTERA: ELATERIDAE) BAJO
CONDICIONES DE LABORATORIO**

al presentarlo como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Atentamente,



Marco Roberto Cancino Avalos

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Ser supremo. Gracias por derramar tus dones sobre mi, para alcanzar una meta más. Señor: tu elegido se alegra por tu fuerza ¡y cuánto gozo con la victoria que me has concedido! Has cumplido los deseos de mi corazón, y no me has negado lo que pedían mis labios. Te adelantaste a bendecirme con el éxito, y has puesto en mi cabeza una corona de victoria. Te pedí vida y me la has concedido, una vida larga y duradera. Mi victoria ha engrandecido tu fama, me has vestido de honor y majestad, y me concedes bendiciones incesantes. Porque confío en el Señor, con la gracia del Altísimo no fracasaré. Ven señor con tu fuerza y tu poder: Y al son de instrumentos cantaré tus victorias. (Salmo 21).

MIS PADRES

Jorge Roberto Cancino Toledo
Ruth María Avalos de Cancino
Fuente inagotable de amor, comprensión y paciencia, inculcando principios, ejemplo de esfuerzo y trabajo, éste triunfo rinda tributo y homenaje eterno a ustedes.

MIS HERMANOS

Rodrigo, Raúl, René, Edna, y Arturo, por su apoyo y consejos, con mucho cariño

MI ESPOSA

Paola María Gómez de Cancino
Por tu amor y apoyo incondicional en la culminación de esta etapa de mi vida.
Con todo mi amor.

MI HIJO

Diego Roberto, que este esfuerzo contribuya a que tenga un futuro mejor.

MIS ABUELITOS

Gracias por su amor y sus consejos.

MI FAMILIA

A todos con mucho cariño. Especialmente mis tías Edna y Sandra, por su apoyo y por creer en mi. A mis tíos Mynor, Sergio y Marco Tulio, por su apoyo, con todo cariño.

MIS AMIGOS

A quienes no hace falta mencionar, en su corazón saben quienes son, gracias por estar siempre ahí.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS

MIS PADRES

MI PATRIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

COLEGIO SAN JOSÉ DE LOS INFANTES

AGRADECIMIENTOS

A:

Ingenio La Unión S.A., a sus directivos y muy especialmente a la Gerencia de Operaciones y la Superintendencia de Campo, por su apoyo técnico y económico para la ejecución de la presente investigación.

Departamento de Investigación Agrícola, de Ingenio La Unión S.A., muy especialmente al Ing. Agr. Victor Azañón por asesorar y apoyar el presente trabajo de tesis.

Departamento de Plagas y Enfermedades, de Ingenio la Unión S.A., muy especialmente al Ing. Agr. Victor Hugo Motta, por su apoyo técnico y logístico y al personal del laboratorio de *Metarhizium* por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Bioasesoria Internacional S.A., al Dr. Francisco Badilla, por su apoyo en los lineamientos y desarrollo de la presente investigación.

Facultad de Agronomía, al Ing. Agr. Marco Vinicio Fernández por su valiosa colaboración en el presente trabajo de tesis y supervisión de mi Ejercicio Profesional Supervisado (E.P.S.). al Dr. Edin Orozco por su orientación y colaboración en el presente trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

CONTENIDO GENERAL

INDICE DE CUADROS..... iii

INDICE DE FIGURAS.....iv

RESUMEN.....v

1. INTRODUCCIÓN 1

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA..... 2

3. MARCO TEORICO 3

 3.1. MARCO CONCEPTUAL..... 3

 3.1.1. Plagas del suelo en caña de azúcar 3

 3.1.2. Gusano alambre..... 4

 3.1.2.A. Ciclo de vida 4

 3.1.2.B. Huevo 4

 3.1.2.C. Larva..... 4

 3.1.2.D. Pupa..... 5

 3.1.2.E. Adulto..... 5

 3.1.2.F. Importancia y tipo de daño 5

 3.1.2.G. Control de gusano alambre..... 6

 3.1.3. Uso de insecticidas 6

 3.1.4. Control biológico..... 6

 3.1.5. Entomopatógenos, una alternativa para la obtención de biopesticidas..... 8

 A. Ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos (HEP)..... 8

 B. Modo de acción 9

 C. Situación mundial de los HEP..... 9

 D. Perspectivas para el uso de entomopatógenos en la agricultura..... 10

 E. Algunos criterios para la selección de candidatos para el control biológico..... 11

 F. Modo de acción de los hongos entomopatógenos..... 11

 G. Principales vías de infección de los agentes entomopatógenos: 12

 3.1.6. Características generales del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* 12

 A. Historia..... 12

 B. Clasificación sistemática 13

 C. Principales características físicas 13

 3.1.7. Sintomatología de la micosis en insectos por *Metarhizium* spp..... 13

 3.1.8. Identificación de la enfermedad – postulados de Koch..... 14

 3.1.9. Parasitismo, Patogenicidad, virulencia y agresividad 14

 3.1.10. Condiciones para los patógenos 16

 3.1.11. Capacidad de reproducción 16

 3.1.12. Diseminación del inóculo..... 16

 3.1.13. El Parasitismo del hongo..... 17

 3.1.14. Potencial del inóculo 17

 3.1.15. Efecto de los factores climáticos en los hongos entomopatógenos 17

 A. Temperatura 17

 B. Humedad 17

 3.2. MARCO REFERENCIAL 18

 3.2.1. Antecedentes sobre investigaciones sobre gusano alambre en Guatemala 18

 3.2.2. Calibración de la cantidad de hongo utilizado..... 19

 3.2.3. Testigo Absoluto 19

3.2.4. Alimento de las larvas de gusano alambre <i>Dipropus</i> spp.....	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. GENERAL	20
4.1.1. Específicos.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1. PRIMERA FASE	22
6.1.1. Tratamientos evaluados	22
6.1.2. Multiplicación.....	23
6.1.3. Evaluación de la patogenicidad de los 11 aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre mediante prueba máxima.....	23
A. Manejo de las larvas de gusano alambre	23
B. Manejo de los aislamientos.....	23
C. Cantidad de hongo requerida.....	24
D. Prueba máxima (inoculación del hongo).....	24
E. Diseño experimental	24
F. Descripción de la variable respuesta.....	25
G. Análisis de la información.....	25
H. Determinación del Tiempo Letal 50 (TL ₅₀) de los aislamientos del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
6.1.4. Identificación del hongo aislado.....	25
6.2. SEGUNDA FASE	26
6.2.1. Purificación del hongo.....	26
6.2.2. Determinación de la incidencia y TL ₅₀ de los aislamientos del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> revigorizados.....	26
6.2.3. Identificación del hongo aislado.....	26
6.2.4. Determinación del efecto de la revigorización de los aislamientos de <i>M. Anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp.....	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1. PRIMERA FASE	27
7.1.1. Reproducción de aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	27
7.1.2. Determinación de la cantidad de inóculo para prueba de patogenicidad.....	27
7.1.3. Patogenicidad de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp.....	27
7.1.4. Incidencia de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp.....	27
7.1.5. Determinación del TL ₅₀	29
7.1.6. Aislamiento, Caracterización morfológica y reproducción de aislamientos.....	30
7.2. SEGUNDA FASE	31
7.2.1. Patogenicidad de los aislamientos revigorizados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
7.2.2. Incidencia de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp.....	31
7.2.3. Determinación del TL ₅₀ de los aislamientos revigorizados	32
7.2.4. Efecto de la Revigorización.....	33
7.2.5. Aislamiento, Caracterización morfológica y reproducción de aislamientos.....	34
8. CONCLUSIONES	35
9. RECOMENDACIONES	36
10. BIBLIOGRAFÍA	37

11. APÉNDICES.....41

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Importancia histórica de las principales plagas del suelo en la caña de azúcar.....	3
Cuadro 2. Aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> evaluados sobre gusano alambre bajo condiciones controladas, Ingenio La Unión S.A. Escuintla 2003.....	22
Cuadro 3. Porcentajes de germinación y gramos de conidios utilizados de los diferentes aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> en la prueba de patogenicidad bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.....	27
Cuadro 4. Resumen del análisis de varianza a los resultados de mortalidad transformados por arcoseno de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.....	28
Cuadro 5. Resumen de la prueba de medias de Tukey de la mortalidad de los once aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.....	28
Cuadro 6. Características visibles más comunes de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> que mostraron las más altas mortalidades, desarrollados sobre el medio de cultivo de Extracto de Levadura + PDA., Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.....	30
Cuadro 7. Sintomatología visible presentada a nivel general por las larvas de gusano alambre causada por la presencia de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.....	31
Cuadro 8. Resumen del análisis de varianza a los resultados de mortalidad de los aislamientos revigorizados de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.....	31
Cuadro 9. Resumen de la prueba de medias de Tukey de la mortalidad de los aislamientos revigorizados de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre gusano alambre <i>Dipropus</i> spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.....	32

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Tiempo Letal medio (TL_{50}) de mortalidad acumulada de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.....29
- Figura 2.** Curvas de tiempo-% de mortalidad acumulada de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.....33
- Figura 3.** Comparación de las mortalidades de los tratamientos 1, 3, 8, 10 y el testigo absoluto de la primera y segunda fase de los aislamientos de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.....34

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE ONCE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. SOBRE GUSANO ALAMBRE *Dipropus* spp. (COLEOPTERA: ELATERIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

PATOGENICITY OF ELEVEN ISOLATIONS OF *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. AGAINST WIRE WORM *Dipropus* spp. (COLEOPTERA: ELATERIDAE) UNDER LABORATORY CONDITIONS

RESUMEN

Dentro del complejo de plagas de la caña de azúcar, las del suelo, ocupan un lugar importante, donde el gusano alambre, *Dipropus* spp., es considerado una de las plagas de la raíz de la caña de azúcar más importantes. Debido a las grandes extensiones de este monocultivo y gracias a un agroecosistema propicio para su desenvolvimiento se encuentra ampliamente distribuido en la zona cañera de la costa sur de Guatemala, provocando daños de importancia económica para este cultivo.

Para el manejo de las poblaciones de esta plaga se ha recomendado el uso de las tácticas del Manejo Integrado de Plagas, con el propósito de hacer un uso racional de las tácticas de control, debido a la alta capacidad tolerante que esta plaga ha mostrado a los productos agroquímicos, así como contar con mecanismos para mantener las poblaciones por debajo de los niveles de daño económico. Razón por la cual, el uso de agentes biológicos, como los hongos entomopatógenos, se ven como una alternativa viable, por su alta especificidad y eficiencia para la producción de epizootias, haciendo especial énfasis en la utilización de la diversidad biológica presente en el ambiente, mediante la búsqueda, caracterización y utilización de especies nativas e introducidas para el desarrollo de biopesticidas específicos para insectos plagas propias de un lugar.

El presente trabajo consistió en evaluar la patogenicidad de 11 aislamientos del hongo *M. anisopliae* provenientes de la colección de la Unidad de investigación en protección vegetal del Laboratorio de Planta, Suelo y Nutrición de la Universidad de Cornell E.E.U.U., los cuales fueron aislados de hospedantes plaga en diferentes partes del mundo, adquiridos con el objetivo de evaluar su potencial patogénico sobre las diferentes especies del complejo de plagas del suelo de la caña de azúcar en Guatemala.

El experimento se realizó en los laboratorios de *Metarhizium* y Plagas del Suelo de Ingenio La Unión S.A., ubicado en la finca Belén jurisdicción de Santa Lucía Cotzumalguapa en el departamento de Escuintla.

Para la multiplicación de los aislamientos se procedió como se realiza en forma comercial en el laboratorio de *Metarhizium* de Ingenio La Unión S.A. La evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre gusano alambre se realizó mediante Prueba Máxima. Se utilizó un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y 5 repeticiones. Cada unidad experimental contó con 13 larvas. Las lecturas se realizaron cada 24 horas a partir del

momento de la inoculación. Las larvas que fueron encontradas muertas se les practicó un lavado y fueron colocadas en cámaras húmedas para confirmar que su muerte fue causada por el hongo. De las larvas que resultaron parasitadas se procedió a aislar el hongo y se hicieron comparaciones culturales morfológicas con los aislamientos inoculados inicialmente para corroborar que correspondían al mismo hongo.

La variable respuesta fue la incidencia, medida a través de la mortalidad producida sobre las larvas de gusano alambre por cada aislamiento, encontrándose diferencias significativas entre ellos, donde 4 de los 11 evaluados; los aislamientos 23, 472, 2136 y 3621 fueron los que mostraron ser materiales con alto potencial patogénico sobre el gusano alambre. Así mismo se determinaron los tiempos letales 50 mediante curvas de mortalidad como una medida para evaluar la virulencia de estos aislamientos, determinándose que su comportamiento responde a un modelo cuadrático con valores de TL_{50} entre 11 y 24 días. A estos aislamientos se les procedió a determinar la existencia de algún efecto de la revigorización, donde para el caso de mortalidad, se obtuvieron incrementos significativos entre 18 al 20 por ciento, a excepción del aislamiento 472 que solo mostró un incremento del 3 por ciento, mientras que para el TL_{50} no se encontró diferencia significativa para ninguno de los aislamientos.

Los valores de mortalidad y tiempo letal son de gran importancia para poder seleccionar materiales que provoquen una alta mortalidad en el menor tiempo posible, es por ello que los aislamientos 23, 472, 2135 y 3621 se consideran como materiales promisorios para el manejo del gusano alambre *Dipropus* spp, por mostrar un alto potencial patogénico en el laboratorio, por lo que se considera valioso que sean tomados en cuenta en futuras evaluaciones. Además, es importante tomar en cuenta la evaluación de un mayor número de cepas, que permitan nuevas y mejores alternativas para obtener resultados efectivos sobre el gusano alambre en su hábitat natural.

La modernización del campo agrícola apunta últimamente hacia el logro de una agricultura sostenible, más independiente y menos contaminante. Reducir la dependencia del uso de agroquímicos por el uso de agentes naturales sin reducir los rendimientos, en búsqueda de la calidad y la cantidad de la producción, puede asegurar la producción por medio de la estabilidad que confieren las prácticas que promueven la existencia de una mayor biodiversidad en el agrosistema.

1. INTRODUCCIÓN

El gusano alambre por sus hábitos alimenticios produce serios daños al cultivo de la caña de azúcar, *Saccharum* spp., tanto en plantía como en soca, lo cual obliga a realizar resiembras que aumentan los costos del establecimiento del cultivo. Solo en Ingenio La Unión S.A., se reportan alrededor de 700 ha afectadas por gusano alambre en forma focalizada (16, 17, 29).

Para el manejo de esta plaga se recomienda utilizar criterios del Manejo Integrado de Plagas (MIP), implementando todas las técnicas, con el propósito de hacer un uso racional de las tácticas de control así como contar con un mecanismo para mantener las poblaciones por debajo de los niveles de daño económico, donde el empleo de hongos entomopatógenos se muestra como una estrategia viable para el manejo de plagas que habitan en el suelo (17). Estos han adquirido gran importancia en el manejo de plagas, la mayoría por su especificidad y eficiencia en la producción de epizootias, sin afectar insectos benéficos y al hombre, difícilmente crea resistencia en el insecto y la ausencia de residuos en el ambiente (20, 39). Investigaciones de laboratorio han mostrado que diferentes patógenos pueden infectar a un mismo insecto y que un mismo patógeno puede infectar a diferentes insectos, aunque la virulencia o especificidad puede presentar variaciones extremas para cada uno de los hospedantes (3, 8, 16). En el caso de *M. anisopliae* se sabe que es un hongo con un amplio rango de hospedantes, para 1975 ya se tenía reportado que podía atacar a más de 200 especies de insectos (5). Actualmente en el laboratorio de *Metarhizium* de Ingenio La Unión S.A., ubicado en la finca Belén jurisdicción de Santa Lucia Cotzumalguapa en el departamento de Escuintla, se cuenta con varios hongos entomopatógenos aislados de plagas en otros países, los cuales provienen de la colección del Plant Protection Research Unit, U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory of Cornell University, adquiridos con la finalidad de tener alguna posible alternativa para el manejo del complejo de plagas de la caña, de los cuales aún se desconocen sus potencialidades patogénicas sobre dichas plagas en Guatemala.

Lo anterior marca el interés y la importancia de nuevas investigaciones bajo condiciones que permitan mantener controladas todas las variantes de los factores involucrados, ya que solo de esta manera se puede llegar a conocer a cabalidad las potencialidades de dichos aislamientos. Considerando la importancia artífice de las pruebas de laboratorio, se evaluó la patogenicidad de 11 aislamientos de *M. anisopliae* con la finalidad de determinar los efectos patogénicos potenciales sobre el gusano alambre, considerando su importancia por dar la pauta a futuras investigaciones sobre dosificación, medios de multiplicación, el diseño de diferentes prototipos de formulación, efectos colaterales con el ambiente, entre otras, que darán solidez al emprendimiento de una serie de pruebas de campo conducentes a la evaluación y validación de la actividad biopesticida de estos aislamientos en condiciones de cultivo, para que finalmente se pueda dar un proceso de industrialización y registro ante las autoridades competentes para garantizar la seguridad de las aplicaciones comerciales. Permitiendo de esta manera el desarrollo de productos que empleen agentes naturales como los hongos entomopatógenos, con el ánimo de presentar una alternativa de manejo implementable dentro de un manejo integrado plagas de importancia económica como el gusano alambre.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El gusano alambre es una de las plagas de la raíz de la caña de azúcar más importantes, produciendo serios niveles de daño, por lo que su manejo es de suma importancia. El daño lo causan las larvas, destruyendo las yemas germinativas, produciendo una reducida germinación, daño del rebrote, haciendo perforaciones en brotes, puntos de crecimiento en tallos jóvenes y volcamiento de caña ya desarrollada. Esta plaga se caracteriza por estar presente en el todo el ciclo del cultivo (17).

El manejo de esta plaga normalmente se ha realizado con productos químicos, lo cual ha adquirido gran importancia por las repercusiones que puedan tener dichas aplicaciones en la contaminación del ambiente y el gasto económico que representa su manejo (28, 38, 46).

En estudios recientes se ha observado que el uso de insecticidas químicos han resultado ser una medida poco eficiente para el manejo de las poblaciones del gusano alambre, a pesar de la utilización de altas dosis, se ha observado que el uso de insecticidas químicos no producen efectos significativos en el gusano alambre, mostrando una alta capacidad tolerante a estos, lo cual ha venido a ser cada vez menos rentable para su manejo. Evaluaciones internas de Ingenio La Unión S.A. han mostrado que las prácticas de volteo antes de la siembra reducen significativamente las poblaciones de gusano alambre, aunque estas todavía permanecen por arriba de los niveles de daño económico, además de que en caña soca esta actividad no puede realizarse, permitiendo que las poblaciones de esta plaga se incrementen; razón por la cual, se ha prestado mucha importancia al control biológico, donde el empleo de hongos entomopatógenos se muestra como una estrategia viable para el manejo de plagas que habitan en el suelo (15, 19, 28, 29, 34, 35, 38).

Sabiendo que actualmente no se poseen mecanismos efectivos para el manejo de esta plaga, y que se cuenta con materiales con patogenicidad potencial en plagas del suelo, cuya efectividad sobre gusano alambre aun se desconoce, se hace necesario iniciar con investigaciones que evalúen la patogenicidad de estos aislamientos sobre plagas de importancia como esta, para en un futuro determinar la posibilidad de poder incluir alguno de ellos como una nueva alternativa para su manejo (28).

3. MARCO TEORICO

3.1. Marco conceptual

3.1.1. Plagas del suelo en caña de azúcar

Una de las principales actividades agronómicas en el manejo de la caña de azúcar *Saccharum* spp, es el combate de plagas insectiles y entre estas, las denominadas plagas del suelo juegan un papel importante en la producción. En el cuadro 1 se muestra la importancia histórica de las principales plagas del suelo de la caña de azúcar, donde una de ellas es el gusano alambre, el cual en Guatemala se ha identificado taxonómicamente dentro de los géneros *Agriotus* y *Conoderus* (Coleoptera: Elateridae) (8, 33, 35, 38, 44). Pero en la determinación taxonómica de una muestra de las larvas utilizadas en este trabajo, utilizando una clave para la identificación de larvas de géneros de Elateridae traducida por el Ingeniero Agrónomo M.Sc. Entomólogo Taxónomo Samuel Córdova, del Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se encontró que pertenecían al genero *Dipropus*, que es como se nombra al gusano alambre en este trabajo.

Cuadro 1. Importancia histórica de las principales plagas del suelo en la caña de azúcar.

PLAGA	1991	1994	1996	1997
GUSANO ALAMBRE	2	2	2	2
GALLINA CIEGA	1	2	1	2
CHINCHE HEDIONDA	3	1	2	2

Primaria = 1; Secundaria = 2; Terciaria = 3; Fuente: Salguero 1998 (45)

La abundancia del gusano alambre está marcada según las condiciones climáticas y tipo de suelo de cada estrato de la zona cañera guatemalteca. Los muestreos recientes realizados por el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICANÑA) indican que las poblaciones de gusano alambre son mayores en el estrato bajo con 18,09 larvas/m², seguido por el estrato medio y alto con 6,39 y 3,16 larvas/m², en promedio (12). Estos promedios podrían considerarse como bajos, lo cual es debido a que con estos se generaliza toda el área de muestreo, mientras que el área real de daño esta dada en forma focalizada, donde se pueden encontrar hasta más de 100 larvas por m² (26).

Así mismo se menciona que el control para estas plagas se hace difícil debido a que las mismas se refugian en las raíces, los estratos más profundos del suelo y en restos de cosecha. Signos de infestaciones severas pueden identificarse por síntomas de amarillamiento externo y crecimiento retardado del cultivo. Por lo que el CAÑAMIP ha considerado que su control debe basarse en criterios del Manejo Integrado de Plagas (MIP), implementando técnicas de carácter biológico, para evitar infestaciones sorpresivas, por medio de monitoreos, con el propósito de hacer un uso racional de insecticidas, utilizándolos solo como mecanismo para mantener las poblaciones por debajo de los niveles de daño económico (17, 35).

3.1.2. Gusano alambre

Se conoce comúnmente a las larvas de la familia Elateridae (Coleoptera), como gusanos alambre, llamados así porque son de cuerpo duro, alargado, cilíndrico y de color café rojizo, lo cual asemeja a un pedazo de alambre de cobre o bronce. El daño lo causan las larvas, mediante la destrucción de las yemas germinativas, perforaciones en brotes de caña y del punto de crecimiento de los tallos jóvenes (37).

Garza (23) indica que el daño causado por el gusano alambre se intensifica en terrenos donde anteriormente eran pastizales, aunque en general, están ampliamente distribuidos y catalogados entre los insectos más destructivos y difíciles de combatir.

3.1.2.A. Ciclo de vida

El ciclo de vida del gusano alambre varía de 4 a 5 años, aunque generalmente se menciona que el ciclo de los elateridos varía de 2 a 6 años. La ubicación en el suelo puede variar según las condiciones de humedad y temperatura principalmente (23, 37).

3.1.2.B. Huevo

Este estadio varía de 7 – 30 días puesto en el suelo húmedo, generalmente bajo el zacate o las malezas. Estos son pequeños, blancos, esféricos o un poco ovalados llegando a medir 0.5 mm de longitud; eclosionando tras unos días o unas cuantas semanas, dependiendo de la temperatura y del sitio de postura (23, 37).

3.1.2.C. Larva

Este estadio varía de un mes a varios años dependiendo de la especie. Es elongada, cilíndrica u oval en sección transversal, amarilla a café, con una cutícula dura brillante, 3 pares de patas cortas, pobremente desarrolladas con segmentación bien marcada. El último segmento abdominal (noveno) puede ser largo y/o esculturado, su forma se puede usar para distinguir entre las especies y para distinguirlo de las larvas de tenebrionidae, en la cuales este segmento es corto y romo (23, 37).

Las larvas varían en longitud de 1.25 a 3.75 cm cuando están desarrollados. Las larvas que incuban siempre viven en el suelo, pasan de 2 a 6 años en el suelo alimentándose de las raíces de los pastos y otras plantas, hasta que se transforman en pupa. A medida que el suelo se vuelve caliente y seco, las larvas emigran hacia abajo, de tal manera que a veces es difícil encontrarlas durante los veranos secos, aun en los campos infestados severamente. La mayoría de las especies cambian a una pupa desnuda, suave, y en unas semanas más al estado adulto alcanzando su desarrollo completo (23, 35, 37).

3.1.2.D. Pupa

El estadio varía entre 6-14 días, es de color blanca a amarillo pálido, delicada, en el suelo, dentro de una cámara pupal débil. Después de 3 a 4 semanas, emergen como adultos (37).

3.1.2.E. Adulto

Las especies varían de 3 a 10 mm de longitud; todos son escarabajos duros, elongados, los élitros se juntan en punta, el pronoto es ancho, con márgenes a menudo proyectados hacia atrás en puntas café o naranja. Estos cuando se les coloca de espaldas pueden dar un salto de varios centímetros y producir al mismo tiempo un fuerte "cric" (35, 37).

Los adultos, que comúnmente miden más o menos 1.25 cm de largo, permanecen enterrados en el suelo hasta la primavera siguiente. El invierno es pasado principalmente en los estadios larvarios, pupal y adulto, en el suelo. A principio de la primavera los adultos se vuelven activos y vuelan, algunas especies son atraídas fuertemente por lo dulce; estos se pueden capturar en grandes cantidades colocando unas cuantas gotas de jarabe en la parte de arriba de los postes de las cercas, u otros lugares expuestos a los exteriores. Ellos son escarabajos de concha dura, generalmente de color café, grisáceo o casi negro, un tanto alargados, aerodinámicos con el cuerpo adelgazándose más o menos hacia los extremos. La cabeza y el tórax se ajustan cercanamente contra la cubierta de las alas, lo que protege la parte posterior del abdomen. La unión justamente en el frente de las cubiertas de las alas es fuerte y flexible, y cuando los escarabajos son volteados o caen sobre sus dorsos, ellos golpean la parte media del cuerpo contra el suelo, de tal manera que se lanzan hacia el aire por varios centímetros. Las hembras de las especies que son más perjudiciales, hacen galerías en el suelo y ponen sus huevos principalmente alrededor de las raíces de los pastos. Los adultos viven de 10 a 12 meses, la mayor parte de este tiempo, y todo el de los otros estados, es pasado en el suelo. Poco después de aparearse mueren los machos y las hembras durante la primavera o a principios del verano, cuando la oviposición ha terminado (37). Muy pocos gusanos alambre pasan al estado de adulto en un año, esto depende de las condiciones favorables de alimentación, suelo y temperatura (35, 37). Los adultos aparentemente no se alimentan mucho pero pueden comer una cierta cantidad de partes de hojas y flores (polen) (27).

3.1.2.F. Importancia y tipo de daño

En la zona templada los gusanos alambre se encuentra entre los insectos más difíciles de combatir, los cuales están catalogados como las plagas más destructivas y más ampliamente distribuidas en el maíz (*Zea mays*), caña (*Saccharum* spp), granos pequeños, pasto, papa (*Solanum tuberosum*), hortalizas y flores. Los cultivos que son atacados por los gusanos de alambre, a veces fallan en su germinación, puesto que los insectos comen el germen de las semillas o las ahuecan por completo, dejando solo la cutícula, en el caso de la caña destruyen las yemas germinativas, perforaciones en brotes de la caña en soca y del punto de crecimiento de los tallos jóvenes, produciendo una reducida germinación que obliga a realizar resiembras que aumentan los costos de establecimiento del cultivo. El cultivo puede

no brotar bien, o puede empezar bien y después volverse ralo y desigual a medida que los gusanos alambre barrenan en las partes subterráneas del tallo, ocasionando que la plantilla se marchite y muera, aunque ellos no la corten completamente. (35, 37).

Sus daños son generalmente más severos en los cultivos sembrados en terreno de césped (pastizales) o al segundo año después de este (37). Tenhet y Howe citados por Garza (23) mencionan que el daño de gusano alambre varía en las diferentes especies de gramíneas, en caña de azúcar, debido a que el tallo es duro, fibroso, raramente es atacado, el daño es principalmente a las raíces, donde las raíces pequeñas son las más atacadas, ya que las cortan tan rápido como se desarrollan, por lo que dejan a la planta literalmente sin crecer por falta de alimento y agua, por lo que en muchos casos las plantas atacadas mueren y disminuye el tonelaje.

3.1.2.G. Control de gusano alambre

Las prácticas culturales de combate son difíciles de aplicar para el gusano alambre, debido a su ciclo de vida relativamente grande y a la necesidad de adaptarlas a cada región y cultivo. Ciertas especies de gusano alambre son abundantes solo en los suelos mal drenados. El drenaje adecuado de dichos suelos, puede evitar por completo el daño por estas especies. En los lugares irrigados, todos los estados de los gusanos alambre pueden ser aniquilados inundando la tierra, de manera que el agua se estanque a unos cuantos centímetros de profundidad durante una semana en la época de calor, cuando la temperatura del suelo a una profundidad de 15 cm promedia 21°C o más. Permitiendo que los 45 cm superiores del suelo se sequen mucho durante varias semanas en el verano, cuando menos una vez cada 6 años. Las rotaciones más, los métodos de barbecho, las fechas de siembra y otras prácticas agrícolas, deben ser estudiadas para cada región agrícola, con referencia especial a las especies de plantas deseadas y las especies particulares de gusanos alambre presentes (23).

Bateman citado por Rodríguez (43) indica que el uso de insecticidas convencionales que en su mayoría afectan al ambiente, representan un peligro para la salud humana y naturaleza en general. Actualmente se presenta como una alternativa ecológica, la utilización de hongos entomopatógenos para el control de estas plagas.

3.1.3. Uso de insecticidas

El empleo de insecticidas granulados en el momento de la siembra, es una práctica común, sin embargo, sólo permite proteger las yemas germinativas de la acción del gusano alambre. El uso de nuevas formulaciones con características de liberación lenta o sistémico aplicado al pie de las cepas, pueden ser opciones que mejoren la eficacia de los insecticidas (35).

3.1.4. Control biológico

Se han iniciado investigaciones respecto de los factores de mortalidad natural con microorganismos como:

Bacillus popilliae, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brogniartii*, nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* entre otros. Actualmente en Guatemala se investigan varias cepas de hongos entomopatógenos en los laboratorios de los ingenios La Unión, Santa Ana y Pantaleón. El monitoreo de estos agentes de control, su aislamiento y las pruebas de virulencia en laboratorio y campo son parte del proyecto de investigación de CENGICANA (35).

El control biológico es definido por Buenaventura y Gómez (14) como la utilización racional de los organismos parasitoides, depredadores y patógenos enemigos naturales de las plagas a fin de mantenerlos a niveles de población inferiores al nivel de daño económico. Se basa ecológicamente en mantener niveles inferiores del patógeno del que pudiera ocurrir en la ausencia de los organismos parásitos, depredadores o enemigos naturales de la plaga.

El control biológico es uno de los métodos más antiguos de control de insectos, aunque Buenaventura y Gómez (14) consideran al control biológico como una ciencia aplicada dentro del control de plagas de reciente creación. La National Academy of Sciences (39) informa que los primeros reportes sobre control biológico fue con el hongo *Beauveria bassiana* parasitando al gusano de seda de la uva. Además informa que la idea de utilizar agentes microbianos para el control de insectos se concibió en el siglo XVIII, al producir masivamente el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. para el control del gorgojo de la remolacha azucarera *Cleonus punctiventur* Ger. Los primeros intentos para utilizar el control microbiano en los Estados Unidos en el siglo XIX fracasaron debido a la poca habilidad de los investigadores para controlar el medio y el poco conocimiento sobre los hongos utilizados. En la década de los años 20's se realizaron otros intentos fallidos en Canadá, Francia y Hungría.

En National Academy of Sciences (39) se menciona que actualmente se han encontrado 1165 microorganismos relacionados con los insectos, casi todos patógenos. De estos, 90 especies y variedades corresponden a bacterias, 260 especies de virus y rickettsias, 460 especies de hongos, 255 especies de protozoarios y 100 especies de nemátodos. Así mismo se indica que las ventajas del control biológico son:

- A. **Permanencia:** Existe perpetuación entre ellos mismos.
- B. **Seguridad:** La mayoría no tienen efectos secundarios sobre el hombre y otros animales.
- C. **Economía:** Se reducen las aplicaciones de productos plaguicidas.
- D. **Especificidad:** Conservan los enemigos naturales presentes en el campo.
- E. **Control asociado:** Pueden usarse con insecticidas selectivos en dosis bajas para un control más rápido y eficiente de la plaga.
- F. **Aplicación:** Puede usarse el mismo equipo de aplicación de productos químicos.
- G. **Resistencia:** Los insectos difícilmente pueden desarrollar resistencia a estos productos.
- H. **Efectos secundarios:** Pueden afectar generaciones siguientes al disminuir la oviposición y la viabilidad de los huevos.

Debido a que el control químico es poco eficiente debido a que requiere hacer contacto con el insecto que está en el suelo a profundidades entre 25 y 60 cm. Investigaciones en otros países han indicado que el control biológico de tipo microbial tiene una alta probabilidad de éxito (12).

3.1.5. Entomopatógenos, una alternativa para la obtención de biopesticidas

Según Devoto *et al.* (20) el término "entomopatógeno" designa a aquellos microorganismos (bacterias, hongos, nemátodos y virus) que son capaces de matar insectos. Los biopesticidas, por otro lado, son aquellos productos utilizados para controlar plagas que tienen como ingrediente activo un organismo vivo o una partícula viral.

A. Ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos (HEP)

Los HEP según Devoto *et al.* (20) se conocen desde que el hombre utiliza insectos para su beneficio, como el gusano de seda y las abejas. Sin embargo, el rápido desarrollo de una agricultura altamente demandante de insumos, requería de productos de fácil disponibilidad y de efecto inmediato, características que cumplían los insecticidas sintéticos. Los organismos entomopatógenos, entonces, fueron desplazados debido a la falta de conocimiento sobre la interacción entre el patógeno, su huésped y el ambiente. El interés hacia esta área se renovó a medida que se fue demostrando los efectos negativos que tienen los insecticidas sintéticos en la salud de las personas y en la calidad del entorno. Algunas de las ventajas de los HEP son:

- A. Especificidad: parasitan sólo una especie o un grupo de especies muy relacionadas, sin afectar especies que no son plaga ni a los enemigos naturales.
- B. Persistencia: si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para parasitar a su hospedero, se reproduce y renueva en forma continua, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
- C. Compatibilidad: se puede aplicar mezclas de HEP o bien, combinaciones de entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas para lograr efectos superiores a los logrados con aplicaciones por separado de cada producto.
- D. Inocuidad ambiental: no contaminan el medioambiente ni afectan al hombre y otros animales superiores.

Según Devoto *et al.* (20) algunas de las desventajas que han limitado el desarrollo de esta técnica en años pasados son:

- A. Factores ambientales: son sensibles a temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).
- B. Almacenamiento: requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas.
- C. Menor velocidad de acción: en general, los biopesticidas no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas, después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente, sin embargo, el insecto deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

B. Modo de acción

Los HEP, al contrario de la mayoría de los insecticidas, prácticamente no actúan por vía digestiva sino que deben adherirse al insecto. Esto explica la especificidad de las diferentes especies de hongos e incluso, de diferentes razas dentro de la misma especie, dado que el hongo logrará atravesar la cutícula del insecto sólo si dispone del conjunto adecuado de enzimas (20).

Una vez adherido el conidio al insecto, éste germina y produce una estructura (apresorio). Cuando el apresorio, gracias a sus enzimas, penetra el tegumento y alcanza el interior del insecto, se extiende, se ramifica y produce toxinas. El insecto modifica su comportamiento, deja de alimentarse, reduce su movimiento y finalmente muere. El cadáver del insecto es rápidamente colonizado por el hongo, interiormente, y luego el micelio sale por aberturas naturales (espiráculos, boca y ano) y zonas blandas. El micelio, que varía de color según la especie, cubre el insecto, impide el desarrollo de otros hongos y le da una apariencia momificada (20).

C. Situación mundial de los HEP

El estudio de los hongos ha dado posibilidad de avanzar en el conocimiento relacionado con el manejo de éstos, de ahí que otras especies sean consideradas en agroecosistemas agrícolas por su gran capacidad para producir epizootias naturales (6).

La clase Hyphomycetes, dentro de la división Deuteromycotina, la cual se caracteriza por producir sus conidios libres, en lugar de estar encerrados dentro de un cuerpo fructífero, esto les permite quedar inmediatamente disponibles para repetir el ciclo a partir de los insectos parasitados. Además, los Hyphomycetes son más productivos, de ciclos más cortos y relativamente fáciles de reproducir en forma masiva, por lo cual no es casualidad que géneros como *Metarhizium* y *Beauveria* sean los más frecuentemente citados en patología de insectos (22).

A nivel mundial, las dos especies más frecuentes y estudiadas son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Estos hongos se conocen comúnmente como "muscardin" blanco y "muscardin" verde, respectivamente, debido al color que toma el micelio una vez que ha terminado de producir conidios. El nombre "muscardin" se debe a la semejanza que adquiere el insecto parasitado con un confite italiano de ese nombre, muy común en el siglo XIX, cuando se inició su estudio (20).

Se ha demostrado la susceptibilidad de más de 200 especies de insectos pertenecientes a los órdenes Coleoptera (escarabajos y gorgojos), Lepidoptera (mariposas y polillas), Orthoptera (langostas), Himenoptera (hormigas), Hemiptera (chinchas), Homoptera (langostinos y pulgones). El conocimiento adquirido hasta hoy ha permitido la aparición de empresas que producen y comercializan HEP. La mayoría se localiza en países europeos (Alemania, Suiza, Holanda, Francia, Bélgica, Inglaterra, Rusia, Dinamarca), pero también existen en América (EE.UU., México,

Brasil, Colombia, Cuba, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua), Asia (China, India, Japón, Israel), Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y África (Sudáfrica, Benin). El gran número de países involucrados en su producción se explica por la gran especificidad de los aislamientos, por lo que un producto que funciona bien para una determinada plaga, difícilmente logrará el mismo éxito contra una plaga diferente e, incluso, contra la misma plaga, pero en un ambiente distinto (20).

D. Perspectivas para el uso de entomopatógenos en la agricultura

El control de plagas según Devoto *et al.* (20) mediante HEP aumentará en la medida que se conozca más sobre la interacción huésped-patógeno-ambiente. El número de investigadores ligados a esta área ha aumentado considerablemente en el mundo, al punto que la Patología de Insectos se ha transformado en una especialidad en varias universidades estadounidenses, brasileñas y europeas. Entre los factores que han presionado por nuevas alternativas de control se puede mencionar:

- A. Aparición de resistencia de algunas plagas hacia los insecticidas de origen químico.
- B. Surgimiento de nuevos sistemas de producción agrícola, como la producción orgánica.
- C. Necesidad de productos inofensivos para otros organismos no perjudiciales.
- D. Ineficacia de los tratamientos actuales para controlar larvas de hábito subterráneo o aquellas que viven en galerías horadadas en tallos y raíces.
- E. Comprobación de los efectos negativos de algunas moléculas sintéticas sobre la salud de los aplicadores y consumidores.
- F. Legislación más estricta en relación a la presencia de residuos en los productos agropecuarios.

Las razones antes expuestas conducen a pensar que los hongos entomopatógenos lograrán ocupar un espacio propio en el control de plagas y que pasarán a constituir, como ya ocurre en otros países, una herramienta eficaz en la agricultura (20).

De acuerdo a Lezama (1992) (31), las propiedades de los hongos entomopatógenos que los hacen interesantes como una alternativa más de uso en el control de plagas son:

- A. Su alto poder patogénico.
- B. La conservación de la virulencia en la preparación, antes de su aplicación y después de un período de almacenaje.
- C. La especificidad que presentan (definida como la adaptación recíproca entre el entomopatógeno y su hospedante, en relación con las condiciones del medio en el cual se encuentran).
- D. Sus posibilidades de multiplicación y conservación en condiciones económicamente rentables.
- E. Su gran poder de persistencia.
- F. Su inocuidad para insectos parasitoides, depredadores, peces y vertebrados.

E. Algunos criterios para la selección de candidatos para el control biológico (46)

- A. Los primeros candidatos deben ser las plagas introducidas produciendo control biológico.
- B. El impacto económico de la plaga en la región.
- C. Evaluación del éxito de biocontrol en otros países.
- D. Plagas donde otros métodos de control han fracasado.
- E. Plagas que no estén bajo cuarentenas.
- F. Plagas con un umbral económico alto y que no son vectores de enfermedades.
- G. Plagas únicas del cultivo.
- H. Plagas con reconocidos enemigos naturales efectivos en otros países.
- I. Análisis de costos y beneficios.

F. Modo de acción de los hongos entomopatógenos (6)

De manera general presentan las siguientes fases de desarrollo sobre los hospederos:

- A. **Germinación:** encontrando condiciones favorables de humedad y temperatura el hongo germina sobre el insecto produciendo un tubo germinativo, la cual ocurre en un mínimo de 12 horas a una temperatura de 23 a 30 °C y humedad relativa más o menos elevada.
- B. **Formación de apresorios:** en la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura denominada **apresorio**.
- C. **Formación de grampa de penetración:** en la parte inferior del apresorio aparece la formación de estructura punteada la cual penetra la epicutícula y procutícula del insecto. No todos los hongos presenta esta estructura.
- D. **Penetración:** se involucran dos procesos principales: uno físico debido a la presión de las hifas que rompe las áreas membranosas o esclerosadas y un químico, resultado de la elaboración de enzimas que facilitan la penetración mecánica en el área de la procutícula aparecen síntomas de histólisis (descomposición de tejido por acción enzimática).
- E. **Colonización:** a partir de la penetración inicial se da el proceso de colonización del hospedero por el hongo. Las hifas que penetran sufren un engrosamiento y se ramifica, inicialmente por el tegumento del insecto y posteriormente en la cavidad general del cuerpo, a partir de ese momento se forman las colonias del hongo y otros cuerpos hifales, antes de la muerte del insecto. Después de la muerte del insecto el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por las hifas filamentosas más no ocurre la desintegración del insecto ya que este segrega sustancias antibacterianas. El tiempo de colonización puede variar entre 76 a 120 horas dependiendo del insecto, el patógeno y las condiciones ambientales.
- F. **Reproducción del patógeno:** 48 a 60 horas después de la muerte del insecto que ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación, las hifas comienzan a emerger por las partes más frágiles y luego la cutícula utilizando la presión mecánica (La boca, el ano, las regiones intersegmentales y tarsos, son las áreas de

salida del hongo). La producción de conidios ocurre entre 24 y 48 horas después de la emergencia de las hifas, bajo condiciones de elevada humedad y temperaturas entre 20 a 30 °C, (dependiendo del patógeno).

G. Principales vías de infección de los agentes entomopatógenos:

(según la National Academy of Science (1987) (39).

- A. Oral:** ingerido con el alimento. Principalmente virus, rickettsias, bacterias, nemátodos, protozoarios y algunos hongos .
- B. A través del tegumento íntegro o tráquea.** Principalmente hongos y algunos nemátodos.
- C. Parenteral.** Invasión por mordedura o lesión al tegumento del insecto.
- D. A través del huevo.** Ya sea adentro o por encima. Principalmente virus, rickettsias, espiroquetas y protozoarios.

Rodríguez (1993), enumera las siguientes estrategias para el uso de entomopatógenos:

- A.** Considerar la interacción entre el patógeno, huésped y ambiente (incluido el cultivo principal). Los patógenos en control biológico son de alta especificidad (no daña insectos benéficos y/o al hombre ni a otros invertebrados). La virulencia del patógeno determina la concentración requerida para infectar al huésped y el tiempo para producir mortalidad (42).
- B.** En general, se considera el control natural como el mantenimiento de las fluctuaciones de la densidad de un organismo dentro de un tiempo mayor o menor en un período, por la acción de los factores bióticos y/o abióticos del medio. Huffaker y Messenger (1964) citados por Buenaventura y Gómez (14) consideran que el control natural es permanente.
- C.** Es muy importante conocer las vías de infección de los patógenos, normalmente los hongos penetran vía tegumentos, a través de la actividad enzimática o presión mecánica producida por el tubo germinativo (apresorio). Principalmente en regiones intersegmentales, tarsos y espiráculos. (6)

3.1.6. Características generales del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*

A. Historia

Metchnikov (1879) señaló al hongo por primera vez, siendo Sorokin (1879) quien instituyó el género *Metarhizium*. Fue Hart el primer investigador que encontró *Metarhizium* parasitando *Aeneolamia sp* (42). Las primeras técnicas de cultivo de *Metarhizium* a gran escala fueron desarrolladas en el instituto Ucraniano de protección de plantas, Kiev, URSS. Fue el primer hongo utilizado en la lucha biológica contra insectos dañinos (6). En CODECAP (Brasil) se inicio la multiplicación comercial del hongo. Rodríguez (42) indica que la información generada en Brasil sobre la producción masiva del hongo ha servido para que diversos países tengan producciones a nivel semicomercial.

B. Clasificación sistemática

Reino: Mycetea
 División: Amastygomicota
 Subdivisión: Deuteromycotina
 Clase: Hyphomycetes
 Orden: Moniliales
 Familia: Moniliaceae
 Género: *Metarhizium*
 Especie: *Metarhizium anisopliae* (2,4,32).

C. Principales características físicas

Bernal (1994) indica que el hongo se caracteriza por presentar conidióforos que forman capas de esporas, las cuales se producen en cadenas basipétalas compactas en columnas, de forma ovoide a cilíndrica y unicelulares. Los conidios son uninucleados, alargados, de color verde, formando usualmente un solo tubo germinativo en el área polar. Presentan una pigmentación verde y su tamaño diferencia a las especies. El micelio es hialino y los conidióforos sencillos o ramificados. Se ha observado buen crecimiento del hongo en medios artificiales orgánicos e inorgánicos; principalmente en PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y medios de arroz. La rapidez de reproducción del hongo (mayor a la del insecto) imposibilita que se desarrolle resistencia al hongo. El hongo se encuentra en forma saprofitica en el suelo y como parásito en insectos (9).

M. anisopliae es un hongo con un amplio rango de hospederos, para 1975 se tenía reportado que podía atacar más de 204 especies de insectos (5).

Toledo y Badilla (48) mencionan que la selección de razas es fundamental para el desarrollo de un buen programa, debido a que este entomopatógeno presenta diferencias marcadas de patogenicidad y virulencia entre aislamientos de una determinada especie lo cual ha sido demostrado por varios autores.

Debido al bajo impacto que produce en el ambiente y fauna, durante los últimos años se ha ido incrementando el uso del hongo *Metarhizium anisopliae*, como parte del manejo integrado de plagas, por sus características patogénicas contra muchas plagas, su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso, lo cual representa una alternativa viable para el combate de plagas en algunas regiones cañeras (43).

3.1.7. Sintomatología de la micosis en insectos por *Metarhizium spp* (36, 40)

- A. **Cambios de conducta:** pérdida del apetito, apatía, movimientos débiles y descompasados debido a parálisis parciales, finalmente pierde el reflejo de enderezamiento permaneciendo encorvado.

- B. Decoloración:** los cambios de color que ocurren en insectos atacados pueden deberse al color del mismo hongo, ó a pigmentos que éste produce.
- C. Cambios de estructura interna y externa:** el hongo en el hospedante perfora las membranas intersegmentarias del abdomen, las hifas invaden además del tejido adiposo, los sistemas musculares y nerviosos, la presencia del propio hongo llenando el cuerpo del hospedante da la característica rigidez post-mortal del insecto.
- D. Alteraciones fisiológicas del insecto:** Aumento exagerado de oxígeno, pérdidas de peso, histólisis producto de la actividad enzimática.

Estos síntomas se pueden presentar a un mismo tiempo o de modo sucesivo. En 4 a 7 días se presenta la mayor mortalidad.

3.1.8. Identificación de la enfermedad – postulados de Koch

(Tomado y adaptado de Agrios) (2).

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todos los insectos enfermos que se examinen.
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito obligado), o bien debe permitirse que se desarrolle sobre un hospedante susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en insectos sanos de la misma especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en los hospederos inoculados.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

3.1.9. Parasitismo, Patogenicidad, virulencia y agresividad

Un parásito es el organismo que vive ya sea dentro o fuera de otro organismo, del cual obtiene su alimento, y a la relación entre un parásito y su hospedante se denomina Parasitismo, el cual se encuentra estrechamente relacionado con la Patogenicidad, que se refiere a una característica genética de un microorganismo, que lo lleva a penetrar en un insecto y causar la enfermedad, es decir; la alteración que ocasiona un parásito sobre una o varias de las funciones esenciales del insecto, debido a la capacidad que tiene el parásito de invadir y establecerse en su hospedante, que por lo general provoca el desarrollo de una enfermedad en el hospedante. El factor que permite el desarrollo de una cierta enfermedad en un hospedante es la presencia, en el patógeno, de uno o más genes que determinan la especificidad o virulencia sobre el hospedante en particular; además, se piensa que el hospedante tiene ciertos genes que determinan su susceptibilidad y especificidad para cierto patógeno. La virulencia es entonces “el grado de patogenicidad” de los aislamientos hacia un hospedero específico. Así, para una misma especie de hongo puede haber diversas cepas o

aislamientos con distintos grados de virulencia, cuando son aplicados en las mismas dosis y condiciones ambientales (2, 6).

De hecho, algunos patógenos son capaces de atacar a muchas clases (a veces cientos) de insectos hospedantes. Al parecer, esos patógenos pueden atacar a varios hospedantes debido a que tienen muchos genes diversos para la virulencia o bien debido a que estos genes para la virulencia de alguna manera tienen un espectro mucho más amplio de especificidad hacia el hospedante que los que generalmente tienen los patógenos más especializados. Sin embargo, cada especie insectil quizá es susceptible a un número variable de patógenos. Esto significa que una sola especie insectil tiene genes para la susceptibilidad que le permitirían ser infectada por cualquiera de los patógenos a los que es susceptible (2).

El gen o los genes que determinan la virulencia en el patógeno generalmente son específicos para uno o varios tipos relacionados de insectos hospedantes. Así mismo, los genes que hacen que un insecto hospedante sea susceptible a un determinado patógeno sólo existen en ese insecto y quizá también en algunos tipos relacionados de insectos hospedantes. Por lo tanto, lo que determina el inicio y desarrollo de las enfermedades en los insectos es la presencia e interacción concurrente de genes específicos que determinan la virulencia en el patógeno y la susceptibilidad en el insecto hospedante. Así, el patógeno posee un juego de genes para la virulencia que existen específicamente en él y que actúa específicamente sobre su hospedante u hospedantes. Por otra parte, cada hospedante tiene un juego de genes que determinan su susceptibilidad contra un patógeno en particular, y esos genes sólo existen en ese hospedante en particular y, al parecer, sólo son específicos de un determinado patógeno. La especificidad de los genes que determinan las características de virulencia o susceptibilidad explica el por qué un patógeno que es virulento sobre un hospedante no es virulento sobre los demás tipos de insectos hospedantes y por qué un insecto hospedante que es susceptible a un patógeno no es susceptible a todos los demás patógenos de otros insectos hospedantes (6, 26).

La especificidad es una de las características más importantes de estos hongos, lo que representa una ventaja al no dañar organismos benéficos. Entre las variables que afectan la especificidad de algunos aislamientos de hongos entomopatógenos hacia un determinado hospedero, están la habilidad de las conidias para adherirse al tegumento y una vez que el hongo ha penetrado en la cavidad corporal, su capacidad para producir toxinas (6, 26).

Los términos de virulencia y agresividad son empleados como sinónimos en patología de insectos, e indican niveles de daño provocado por los patógenos. Se dice que un patógeno es virulento cuando este incide sobre un gran número de individuos produciendo una epizootia, así mismo se relaciona a la virulencia con la velocidad con que un patógeno se introduce en un hospedante y lo mata en un Tiempo letal medio (TL_{50}) que no es más que el plazo que media entre la administración del agente X y la muerte del 50 % de los individuos experimentados (6, 16, 17).

Se ha señalado que el alto grado de diversidad genética de *M. Anisopliae* estaría relacionado con la localización

geográfica y grupos de patogenicidad, el aislamiento geográfico y la capacidad de dispersión de las esporas, especialmente para *M. anisopliae*, pueden ser importantes en la evolución de los diferentes genotipos. Sin embargo, consideran que la variabilidad intraespecífica de los hongos ha sido además caracterizada por diferencias en patogenicidad, y que los casos documentados de variabilidad en la susceptibilidad del hospedero al patógeno demuestran la ocurrencia potencial de coevolución entre el insecto hospedante y el hongo patógeno. Además, su capacidad patogénica es afectada debido a la presión de selección que ejercen factores bióticos y abióticos (6, 26).

Un patógeno que presenta alta virulencia y una alta capacidad de diseminación puede ser llamado como patógeno epizootico y sin duda que debe ser seleccionado para control microbiano. La virulencia de un patógeno puede ser aumentada por medio de estudios de ingeniería genética provocando mutaciones por cruzamientos de patógenos, utilizando otros caracteres de interés como resistencia a la luz ultravioleta, temperatura, humedad, tiempo de almacenamiento, de esta manera la raza mejorada pueda competir mejor bajo las condiciones ambientales que se presenten (6).

3.1.10. Condiciones para los patógenos

La primera barrera que pone el insecto a la penetración del patógeno es la cutícula, la cual difiere marcadamente entre el estadio en que se encuentre el insecto, por lo cual no necesariamente un buen aislamiento de un entomopatógeno para adulto, va a ser igualmente efectivo para la larva. Esta diferencia deberá tenerse presente en las futuras evaluaciones de susceptibilidad de especies de insecto (6).

La presencia de un amplio rango de hospedantes en el patógeno puede explicar las adaptaciones patológicas para producir enfermedad en diferentes hospedantes. Además las condiciones bajo las cuales se encuentren los patógenos para la ocurrencia de las epizootias son muy importantes. Estas deben coincidir con un período favorable para la susceptibilidad del hospedante para el desenvolvimiento del patógeno y ocurrencia de la epizootia (22).

3.1.11. Capacidad de reproducción

Para desencadenar epizootias el patógeno debe presentar una alta capacidad de reproducción. Todos los grandes grupos de patógenos en forma general presentan una elevada capacidad de reproducción, lo que los diferencia es su capacidad de diseminación (6).

3.1.12. Diseminación del inóculo

Una alta capacidad de diseminación del patógeno es una característica favorable para la ocurrencia de epizootias. Un patógeno puede ser virulento y poseer un elevado potencial de reproducción, pero si no tiene capacidad de diseminación, difícilmente conseguirá provocar la muerte de insectos, ya que la mayoría de entomopatógenos son incapaces de atacar hospedantes por su propia cuenta, por lo que los agentes físicos de diseminación son muy

importantes (lluvia, viento, etc) (6).

3.1.13. El Parasitismo del hongo

El hongo se transmite de hospedante a hospedante por medio de conidios, infectando al insecto a través de la pared del cuerpo o cutícula (algunas veces a través de los espiráculos). Al ingresar el hongo al hemocele, este crece hasta que el insecto se satura de micelio. En este punto, el insecto regularmente muere mientras el hongo continua creciendo hasta producir estructuras que sobresalen a través de la cutícula. (6)

3.1.14. Potencial del inóculo

Para la ocurrencia de epizootias es necesario un potencial de inóculo mínimo, lo cual se entiende por un número de esporas viables sobre órganos susceptibles del hospedante, capaces de iniciar el proceso infectivo, ya que se requiere una cantidad mínima de estructuras del patógeno para causar la enfermedad en un insecto o población de insectos (6).

3.1.15. Efecto de los factores climáticos en los hongos entomopatógenos

Estos influyen en mayor medida en las fases de disseminación, germinación y penetración del patógeno, que durante la fase de colonización, cuando el patógeno está en pleno desenvolvimiento en el interior del cuerpo del insecto (6).

A. Temperatura

Es uno de los factores de mayor importancia, afectando principalmente su estabilidad y eficiencia, ya que de modo general los patógenos no poseen un sistema de regulación de temperatura por lo que se ven altamente afectados por ella. Por lo que para analizar la temperatura en el control microbiano se debe tomar en cuenta el efecto de la temperatura en el hospedero y el microorganismo (6).

Durante la fase de producción de hongos entomopatógenos es importante la temperatura para la germinación de conidios, crecimiento vegetativo y esporulación. Dentro del rango de los 20 a 30 °C se encuentra la temperatura ideal para cada fase de desarrollo del patógeno. Temperaturas de 27 ± 1 °C han sido ideales para la producción artificial de diversos linajes de *Metarhizium anisopliae*, lo cual es de gran importancia en la fase de almacenamiento, ya que dependiendo de está así se prolonga su tiempo de almacenamiento (6).

B. Humedad

La humedad se puede manifestar a través de la lluvia, la humedad del suelo y del aire. Este factor no solo juega un papel importante para el insecto sino para el patógeno. Los insectos se ven afectados en sus actividades en ambientes con niveles de humedad relativa inferior al 40% y no solo los insectos de pequeño porte sino los que viven

en el suelo por falta o exceso de lluvia. En el caso del patógeno la humedad es importante para la germinación y penetración y la reproducción de algunos de ellos. Puede considerarse este factor como más importante que la temperatura ya que esta afecta principalmente la velocidad del proceso de desarrollo de la enfermedad. Los conidios poseen una delgada membrana por la cual pueden ganar o perder agua rápidamente, de acuerdo con la humedad del aire, siendo en atmósferas insaturadas donde se pierde más fácilmente la viabilidad. Se considera que con humedades más elevadas el proceso de infección es más rápido. Se ha constatado que *Metarhizium anisopliae* bajo condiciones de laboratorio, el hongo no esporula muy bien sobre insectos colocados entre 40 a 60 % de humedad relativa, principalmente a temperaturas arriba de los 30°C, bajo condiciones de campo también se ha encontrado que las epizootias están correlacionas con la humedad relativa (70 a 100%) (6).

3.2. Marco referencial

El estudio se realizó en el Departamento de Plagas y Enfermedades de Ingenio La Unión S.A. ubicado en la finca Belén jurisdicción de Santa Lucia Cotzumalguapa en el departamento de Escuintla. Esta localizado a 14° 11' latitud norte 90°53' longitud oeste, a una altura de 146 metros sobre el nivel del mar. Las condiciones se describen en cada una de las pruebas.

3.2.1. Antecedentes sobre investigaciones sobre gusano alambre en Guatemala

En investigaciones internas del Ingenio la Unión S.A. se evaluaron 7 insecticidas para el control de gusano alambre con muestreo en el surco de caña 160 días después de aplicado el producto, no se encontraron diferencias significativas entre los productos y el testigo, donde los insecticidas no probaron ser una técnica viable para controlar las poblaciones de gusano alambre (28).

Un estudio preliminar del control de gusano alambre con semillas de maíz en las siembras de renovación, realizado por el Ingenio La Unión-CENGICANA, donde las semillas fueron tratadas con "Endosulfan" y *Metarhizium*, lo cual indicó que el maíz podría utilizarse como un atrayente de larvas, pero respecto a la mortalidad de las larvas fue insignificante independiente del agente de control, lo cual demuestra la capacidad tolerante del gusano alambre y la dificultad que se debe superar con la patogenicidad de los biológicos, ya que las larvas hicieron contacto con los agentes de control en las raíces del maíz pero no murieron (15,16).

Un reporte de muestreo realizado en marzo del 2003 en la finca Río Azul por el Departamento de plagas y enfermedades del Ingenio la Unión S.A. las áreas aplicadas con insecticida no mostraron diferencias en cuanto a las poblaciones por m² ni en la población de tallos por metro lineal. Por otro lado una evaluación realizada en esta misma finca, se encontraron buenos resultados en la disminución de las poblaciones por efecto del volteo, donde las poblaciones disminuyeron significativamente, pero estas aún permanecían sobre los niveles de daño económico. Actualmente esta es la manera más efectiva con que se cuenta para el manejo de dichas poblaciones (30).

En un estudio sobre la patogenicidad de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis* spp y *Diplogasteritus* spp sobre insectos de los géneros *Dipropus* spp, *Phyllophaga* spp y *Scaptocoris talpa*, realizado por CENGICAÑA, en el caso de la mortalidad de las larvas de gusano alambre solo se alcanzó un 16 por ciento de mortalidad, mientras que para *Phyllophaga* y *S. talpa* se alcanzó una mortalidad del 80 y 28 por ciento respectivamente con *Heterorhabditis*. Mientras que con *Diplogasteritus*, la mortalidad observada en gusano alambre fue del 19 por ciento, 16 para gallina ciega y 12 para chinche hedionda, lo que sugiere que la relación patógeno-hospedante influye sobre el nivel de patogenicidad mostrado (16).

En otro estudio realizado por Azañón (1996) donde se evaluaron 5 diferentes cepas de *M. anisopliae* para el control de chinche salivosa, chinche hedionda, gusano alambre y gallina ciega, mostró que las cinco cepas causaron mortalidad entre 11 y 27 por ciento en chinche salivosa, entre 17 y 23 sobre chinche hedionda, mientras que en gusano alambre solo 2 lograron causar mortalidad con porcentajes del 3 y 6 por ciento, y en gallina ciega ninguna de la cepas causó mortalidad (8).

3.2.2. Calibración de la cantidad de hongo utilizado

Con la finalidad de poder determinar una cantidad de conidios para ser aplicada en la Prueba Máxima, se procedió a realizar una calibración, tomando 10 grupos de 13 larvas de gusano alambre (cantidad que se utilizó en el experimento por cada réplica de los tratamientos evaluados) las cuales fueron colocadas en erlenmeyers de 500 ml y utilizando como patrón la cepa de *M. anisopliae* (PLH), que se produce a nivel comercial en el laboratorio de Control Biológico de Ingenio La Unión S.A.

Las cantidades evaluadas fueron: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1. Con esto se determinó que 0.05 g de conidios era una cantidad que permitía una buena impregnación del hongo sin ser excesiva.

3.2.3. Testigo Absoluto

En el experimento se incluyó un testigo absoluto, como control en el experimento al cual no se le aplicó hongo, únicamente se colocaron las larvas en las cajas plásticas bajo las mismas condiciones a que fueron expuestos los otros tratamientos a los que se les aplicó hongo, sin embargo por fines estadísticos ya que no mostró variabilidad en los datos (no se presentó mortalidad en ninguna de su repeticiones) y por no permitir el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza, no se incluyó en el análisis.

3.2.4. Alimento de las larvas de gusano alambre *Dipropus* spp.

Como alimento de las larvas se utilizaron granos de maíz esterilizados. Los granos de maíz se colocaron en bolsas de papel conteniendo 300 gramos, en autoclave a una temperatura de 132 centígrados durante 15 minutos. Esto con la finalidad de evitar el ingreso de algún agente contaminante al experimento a través de los granos de maíz.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar la patogenicidad de once aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio.

4.1.1. Específicos

1. Seleccionar los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* que muestren ser patogénicos sobre gusano alambre *Dipropus* spp.
2. Determinar la incidencia y tiempo letal 50 (TL₅₀) de los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* con mayores mortalidades sobre gusano alambre *Dipropus* spp.
3. Determinar la incidencia y TL₅₀ de los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* revigorizados sobre gusano alambre.
4. Determinar si existe algún efecto de la revigorización de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp.

5. HIPÓTESIS

Los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* 23 y 1897 obtenidos de *Conoderus* por provenir de un tipo de insecto hospedero relacionado, presentarán las mayores mortalidades sobre el gusano alambre *Dipropus* spp, por efecto de una mayor especificidad hacia el hospedante.

La revigorización de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* producirá un incremento significativo en la incidencia sobre el gusano alambre *Dipropus* spp.

6. METODOLOGÍA

6.1. Primera fase

6.1.1. Tratamientos evaluados

Los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* que se utilizaron para el estudio se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* evaluados sobre gusano alambre bajo condiciones controladas, Ingenio La Unión S.A. Escuintla 2004.

TRATAMIENTO	No. AISLAMIENTO	HONGO*
1	472	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin (CSIRO F155; DAR 29768) J Walker A Wescott. (Coleoptera: Scarabaeidae) Septiembre de 1977. Australia: BCRI, R.D. 66, Rydalmere, New South Wales.
2	1045	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin (ARSEF EPABA A-24) DW Roberts E Matta (Homóptera; Cercopidae) Agosto de 1978 Brasil: Bahia
3	23	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin Rs Soper (f84-1-1) RL Rabb. <i>Conoderus</i> sp (Coleoptera Elateridae 1961. E.U.A.: North Carolina
4	977	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin [GCRI 134-82] RA Hall A Vey. <i>Melolontha melolontha</i> [Coleoptera: Scarabaeidae]. 17 Octubre 1983. Francia.
5	2139	<i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin T Searle (Z). <i>Phyllophaga anxia</i> (Coleoptera; Escarabidae). Agosto de 1985 Canada. Southern Québec.
6	798	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin DA Rodriguez Sierra. Ninfa de <i>Aenolamia varia</i> (Homóptera: Cercopidae). 1979 Colombia: Villavicencio, Meta.
7	1897	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin DW Roberts (V-14 (F84 mutant)). <i>Conoderus</i> spp. (Coleoptera: Elateridae). 11 junio de 1985. E.U.A.: California.
8	3621	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin IMI (299982). <i>Aenolamia varia</i> (Homoptera: Cercopidae). Recolectado el 26 de febrero de 1992. Trinidad y Tobago.
9	1859	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>Majus</i> (Johnston) Tulloch DW Roberts (Pol-32). (Coleoptera: Scarabaeidae). 19 mar 1985. Polonia.
10	2135	<i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin T Searle (F). <i>Phyllophaga anxia</i> (Coleoptera: Scarabaeidae) Julio 1985, Canada Southern Québec.
11	346	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin [CSIRO F124] <i>Apodius tasmaniae</i> [Coleoptera: Scarabaeidae]. 4 Abril 1980. Australia: Adelaide, Sur de Australia

* Procedencia de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* del Plant Protection Research Unit U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory de la Universidad de Cornell

Fuente: Plant Protection Research Unit U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory. 1992 (37).

6.1.2. Multiplicación

Los aislamientos evaluados en el laboratorio de *Metarhizium* se multiplicaron en medio de PDA y extracto de levadura (39 gr de PDA, 10 gr de Extracto de Levadura y 5 gr de agar-agar) como se reproduce en forma comercial en el laboratorio de control biológico del Ingenio la Unión S.A., el medio de cultivo y las cajas fueron esterilizados durante 30 minutos en el autoclave a 132 °C y 20 libras de presión sobre pulgada cuadrada (psi). Seguidamente de esto se procedió al llenado de las cajas en la cámara de flujo laminar. Una vez el medio solidificó se colocaron en la cámara bioclimática a una temperatura de 26 a 28°C durante 10 días con revisiones periódicas cada 3 días para descartar las que se hubieran contaminado, y volverlas a sembrar.

Para reproducirlos, se colocó una muestra del hongo por caja petrí de las colonias desarrolladas de los aislamientos originales. Se inocularon 25 cajas petrí por tratamiento, con la finalidad de tener suficiente material para la prueba. Las cajas inoculadas fueron colocadas en la cámara bioclimática nuevamente hasta que se observó por completo desarrollo del hongo en el medio de cultivo. Estos contaron con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, se hicieron revisiones periódicas para descartar las que estuvieran contaminadas y volverlas a sembrar.

6.1.3. Evaluación de la patogenicidad de los 11 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre mediante prueba máxima

A. Manejo de las larvas de gusano alambre

Se colectaron larvas en campos sin historial de aplicaciones de *Metarhizium anisopliae*, un día antes del establecimiento del experimento. Se realizaron agujeros en áreas de infestación con larvas de gusano alambre *Dipropus* spp., seleccionando larvas de similar tamaño, estas fueron transportadas en una cubeta con tierra húmeda al laboratorio de plagas del suelo de Ingenio La Unión S.A. ubicado en la finca Belén del municipio de Santa Lucia Cotzumalguapa, Escuintla, a temperatura ambiente. Previo a su utilización se procedió a la selección de las larvas, la cual se realizó horas previas al establecimiento del experimento, estas fueron colocadas sobre una bandeja plástica donde se tomaron las más activas con un largo similar (20 - 22 mm) colocándolas en grupos de 65 larvas (cantidad máxima que se logró obtener de la selección) en cajas plásticas, para posteriormente lavarlas con agua esterilizada para remover restos de tierra y algún otro resto que esté adherido al insecto y se secaron sobre papel absorbente estéril para eliminar el excedente de humedad.

B. Manejo de los aislamientos

De las 25 cajas producidas para cada aislamiento se obtuvo el hongo en forma de conidios por medio de un raspado, la cantidad total de hongo se almacenó en cajas petrí, las que se colocaron en la cámara bioclimática por 4 días para eliminar el exceso de humedad, finalmente fueron selladas con papel Parafilm y se almacenaron en una refrigeradora a 4 centígrados. Dos días antes de la prueba máxima se realizó una prueba para determinar el % de germinación, el cual se obtuvo para cada tratamiento colocando una gota de una suspensión de conidios de cada

aislamiento en una caja petrí con medio de cultivo PDA, esparciendo la suspensión con un haza bacteriológica en todo el medio. Las cajas inoculadas se colocaron en la cámara bioclimática por 18 horas. Finalizado el período se hicieron conteos de conidios germinados y no germinados utilizando un microscopio con un aumento de 40 X en tres campos diferentes, haciendo un promedio de las 3 lecturas.

C. Cantidad de hongo requerida

Utilizando como patrón el material de *M. anisopliae* que se utiliza a nivel comercial (PLH) para el control de chinche salivosa *Aeneolamia* sp. se realizó una calibración (ver Marco Referecial inciso 3.2.3.), para determinar una cantidad adecuada de hongo que permitiera una buena impregnación del hongo sobre las larvas, pero que a la vez no fuera excesiva. Con lo que se logró determinar que con 0.05 g de conidios era una cantidad apropiada para establecer el experimento. Todos los tratamientos se estandarizaron con una misma cantidad de hongo con una germinación del 100 %; por lo que en base a la calibración y el porcentaje de germinación de cada aislamiento se determinó la cantidad de hongo utilizada para la prueba máxima.

D. Prueba máxima (inoculación del hongo)

Determinada la cantidad de cada aislamiento se utilizaron erlenmeyers de 500 ml para facilitar la agitación e impregnación del hongo en las larvas. Se colocaron las 13 larvas correspondientes a una repetición del tratamiento en un erlenmeyer, y se les agregó la cantidad de hongo correspondiente, donde fueron agitadas durante 5 minutos, logrando que las larvas estuvieran bien impregnadas del hongo.

Posteriormente utilizando una pinza estéril se individualizaron las larvas en cajas plásticas con una pequeña cantidad de suelo estéril, con 5 gotas de agua estéril, colocando granos de maíz esterilizado como alimento. Se hicieron lecturas todos los días para evaluar mortalidad, las cuales se realizaron hasta que no se presentaron larvas muertas en ninguno de los tratamientos, las larvas que se encontraron muertas se les hizo un lavado de 1 minuto en alcohol al 70 %, un minuto en agua estéril, un minuto en hipoclorito de sodio al 2.5 % y 3 minutos en agua estéril, para eliminar el excedente de la solución clorada, posteriormente se trasladaron a otra caja plástica (cámara húmeda) con papel filtro estéril y una gota de agua estéril hasta confirmar que la muerte de la larva fue causada por el hongo (observándose la colonización del hongo sobre la larva).

E. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con 11 tratamientos (adicionalmente se preparó un testigo absoluto al cual no se le aplicó hongo, sino que las larvas, solo se colocaron en las cajas plásticas bajo las mismas condiciones de los demás tratamientos, pero este no se incluyó en el análisis, sino únicamente como control en el experimento) y 5 repeticiones. Cada unidad experimental contó con 13 larvas (cada caja fue identificada con su tratamiento, repetición y número de subunidad experimental).

F. Descripción de la variable respuesta

1. Incidencia (porcentaje de mortalidad): Para ello, todos los días, iniciando 24 horas después de la aplicación del hongo se revisaron y se apartaron las larvas muertas, las cuales fueron trasladadas a las cámaras húmedas, para observar posteriormente si fue parasitada por el hongo y obtener el dato de muerte confirmada sobre la larva y de esa manera corroborar que la muerte de la larva fue causada por el hongo y no confundirla con algún otro factor que pudiera haber causado su muerte. Estas observaciones se realizaron hasta que ya no se presentó mortalidad en las larvas. El porcentaje de mortalidad se obtuvo a partir de la siguiente fórmula.

$$PM = Ip / It \times 100$$

Donde:

PM = Porcentaje de mortalidad.

Ip = Número de insectos parasitados.

It = Número de Insectos Totales.

G. Análisis de la información

A los datos de mortalidad se le aplicó un análisis de varianza y una prueba múltiple de Tukey, para determinar los aislamientos que produjeron los mayores efectos en el control de larvas de gusano alambre (mayor % de mortalidad).

H. Determinación del Tiempo Letal 50 (TL₅₀) de los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae*

En base a los datos de mortalidad acumulada de los tratamientos que mostraron mortalidades arriba del 50 % y utilizando valores Probit, se elaboraron ecuaciones de regresión características para la relación días de mortalidad y porcentajes de mortalidad, con esto se determinó la curva de mortalidad de los aislamientos y el tiempo requerido para matar al 50 % de las larvas (TL₅₀). El modelo utilizado fue seleccionado en función del análisis de varianza de la regresión (rechazo de la Hipótesis Nula), el menor coeficiente en el Cuadrado Medio del Error dado por el análisis de varianza y el Coeficiente de Determinación (R²) más alto.

6.1.4. Identificación del hongo aislado

Se procedió al aislamiento y reproducción del hongo de los tratamientos utilizados en esta fase (los que presentaron las mayores mortalidades). Una vez reproducidos los aislamientos se procedió a hacer comparaciones de las características culturales morfológicas del hongo inoculado inicialmente (color de la colonia y conidios, sobre una placa con medio PDA + Extracto de Levadura) con el hongo aislado de las larvas parasitadas diferenciados de la siguiente manera: 1. Inoculado inicialmente (aislamiento original), 2. Aislado de gusano alambre Primera fase (revigorizado) Así mismo se anotó la sintomatología producida por los aislamientos sobre las larvas. Esto con la finalidad de corroborar que el causante de la muerte de las larvas fue el hongo aplicado inicialmente.

También se realizaron mediciones del largo y ancho de los conidios utilizando una muestra de 30 conidios de los aislamientos en las etapas mencionadas anteriormente; las lecturas se realizaron utilizando un microscopio con un aumento de 40X y un micrómetro ocular. Además se realizó una prueba colocando una muestra del hongo aplicado inicialmente a las larvas junto con una muestra del hongo aislado de las larvas en una misma caja petri con medio de PDA + Extracto de levadura, para que se desarrollaran juntos; si estos presentaban compatibilidad vegetativa, corresponderían al mismo hongo.

6.2. Segunda fase

6.2.1. Purificación del hongo

De los 11 aislamientos evaluados se seleccionaron los aislamientos que presentaron los porcentajes de mortalidad más altos (arriba del 50 %) en la prueba máxima. Se tomó una muestra de larvas parasitadas de las cuales se aisló el hongo (conidios) para reproducir los materiales. De la larva parasitada, se tomaron muestras de las partes con mayor cantidad de conidios, las cuales se colocaron en cajas petri con medio de PDA y Extracto de Levadura. Se prepararon 20 cajas para cada uno de los cuatro aislamientos, con la finalidad de tener suficiente material para la siguiente prueba.

6.2.2. Determinación de la incidencia y TL_{50} de los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* revigorizados

Una vez reproducidos los materiales se procedió a inocularlos nuevamente sobre larvas de gusano alambre, donde: la colecta y manejo de larvas, manejo de los aislamientos, inoculación del hongo, diseño experimental, variable respuesta, y análisis de la información se procedió de la misma manera que en los incisos 6.1.3.A. al 6.1.3.H.

6.2.3. Identificación del hongo aislado

Se procedió al aislamiento y reproducción del hongo de los tratamientos utilizados en esta fase. Una vez reproducidos los aislamientos se procedió a hacer comparaciones de las características culturales morfológicas de los aislamientos como se indicó en el inciso 6.1.4. únicamente que esta vez se incluyó la última fase: 3. El revigorizado aislado de gusano alambre (segunda fase).

6.2.4. Determinación del efecto de la revigorización de los aislamientos de *M. Anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp

En base a los datos de mortalidad acumulada, se hicieron comparaciones con los resultados obtenidos en las dos fases del experimento, con la finalidad de determinar si hubo algún efecto de la revigorización de los aislamientos sobre la mortalidad del gusano alambre. Para esto se utilizó la prueba de t pareada suponiendo varianzas iguales entre las dos fases.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Primera fase

7.1.1. Reproducción de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*

Los aislamientos lograron reproducirse bajo la metodología utilizada en el Laboratorio de Control Biológico de Ingenio La Unión, S.A., donde el tiempo que tomó para la esporulación en toda la placa de cultivo (10 cm de diámetro con medio PDA + Extracto de Levadura), vario entre 6 y 7 días para los diferentes aislamientos como se muestra en el apéndice 1.

7.1.2. Determinación de la cantidad de inóculo para prueba de patogenicidad

En base a que se había determinado en un bioensayo previo a este; con 0.05 g de conidios puros era una cantidad apropiada para establecer el experimento de prueba máxima para la determinación de la patogenicidad de los aislamientos sobre gusano alambre *Dipropus* spp. Se tomó en cuenta el porcentaje de germinación de conidios de cada aislamiento, el cual se determinó mediante una prueba de germinación de los conidios, con lo que se calculó la cantidad de gramos de conidios que se debía utilizar, como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentajes de germinación sobre el medio PDA + Extracto de Levadura y gramos de conidios utilizados de los diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* en la prueba de patogenicidad bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.

Aislamiento	Porcentaje de germinación	Gramos de Conidios
23	100	0.0500
346	95	0.0526
472	95	0.0526
798	100	0.0500
977	90	0.0554
1045	100	0.0500
1859	90	0.0554
1897	100	0.0500
2135	90	0.0554
2139	95	0.0526
3621	100	0.0500

7.1.3. Patogenicidad de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp

Una vez inoculadas las larvas con los 0.05 g de conidios puros del hongo, se hicieron las correspondientes lecturas cada 24 horas, los resultados de mortalidad diaria y acumulada se muestran en el apéndice 2. Con lo que se determinó que los once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* resultaron ser patogénicos sobre el gusano alambre *Dipropus* spp.

7.1.4. Incidencia de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp

Con los resultados de mortalidad acumulada, se pudo observar que los datos no cumplen el supuesto de

homogeneidad de varianzas por lo que se recurrió a la transformación de datos por medio de la función arcoseno ($\arccos \sqrt{x}$) (50) como se muestra en el apéndice 3.

Con respecto al análisis de varianza se encontró diferencia altamente significativa (nivel de significancia del 1%) en cuanto a la variable Incidencia (% de Mortalidad) de los diferentes aislamientos como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Resumen del análisis de varianza a los resultados de mortalidad transformados por arcoseno de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	11	29345.6584	2934.5658	36.18	0.0001
Error	48	3568.6002	81.1045		
Total	59	32914.2586			

C.V. = 27.57 %.

El análisis indica que los aislamientos poseen variabilidad en cuanto al grado de patogenicidad o virulencia visto desde la incidencia de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre el gusano alambre. El coeficiente de variación en esta fase fue del 27.57%. De acuerdo a los resultados, se realizó una prueba de medias a los tratamientos por medio de la prueba de medias de Tukey. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resumen de la prueba de medias de Tukey al 1% de significancia de la mortalidad de los once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Aislamiento	Media		Grupo Tukey
	*Arcoseno	% Mortalidad	
23	64.538	80.00	A
3621	59.726	73.85	A
2135	59.426	73.85	A
472	55.450	67.69	A
346	40.618	43.08	B
2139	33.406	30.77	B
798	13.225	7.69	C
1045	13.225	7.69	C
977	10.116	6.15	C
1859	4.758	1.54	C
1897	4.758	1.54	C

*Arcoseno = mortalidad transformadas por arcoseno ($\arccos \sqrt{x}$)

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el cuadro 5 se puede observar que los aislamientos 23, 3621, 2135 y 472, son estadísticamente iguales, mostrando una virulencia alta, por otro lado los aislamientos 346 y 2139 son estadísticamente iguales con una

virulencia media mostrando mortalidades inferiores al 50 % mientras que los aislamientos 977, 798, 1045, 1897 y 1859 mostraron una virulencia baja por haber presentado los menores efectos sobre la mortalidad del gusano alambre.

De lo anterior se puede observar que el aislamiento 23 aislado de *Conoderus*, que es un elaterido proveniente de Carolina del Norte, Estados Unidos, mostró los mayores efectos, mientras que el aislamiento 1897, aislado también de *Conoderus* proveniente de California, Estados Unidos, es patogénico, pero con un grado bajo de virulencia sobre el gusano alambre *Dipropus* spp, a lo que se infiere que posiblemente las condiciones dadas en el experimento no fueron adecuadas para la expresión del aislamiento 1897 o que no ha desarrollado un mayor grado de patogenicidad o virulencia por lo que su espectro patogénico sea más específico o, no tan amplio como el del aislamiento 23.

7.1.5. Determinación del TL₅₀

Con los datos de mortalidad acumulada transformados a valores Probit se establecieron las curvas características para mostrar el comportamiento de los tratamientos con mayores mortalidades a través del tiempo, como una consecuencia de la interacción hospedante – parásito (gusano alambre – aislamiento de *M. Anisopliae*). De acuerdo a los datos el modelo que más se ajusta es el cuadrático ($Y = b_2x^2 + b_1x + b_0$), como se muestra en la figura 1. Los análisis estadísticos se muestran en el apéndice 4.

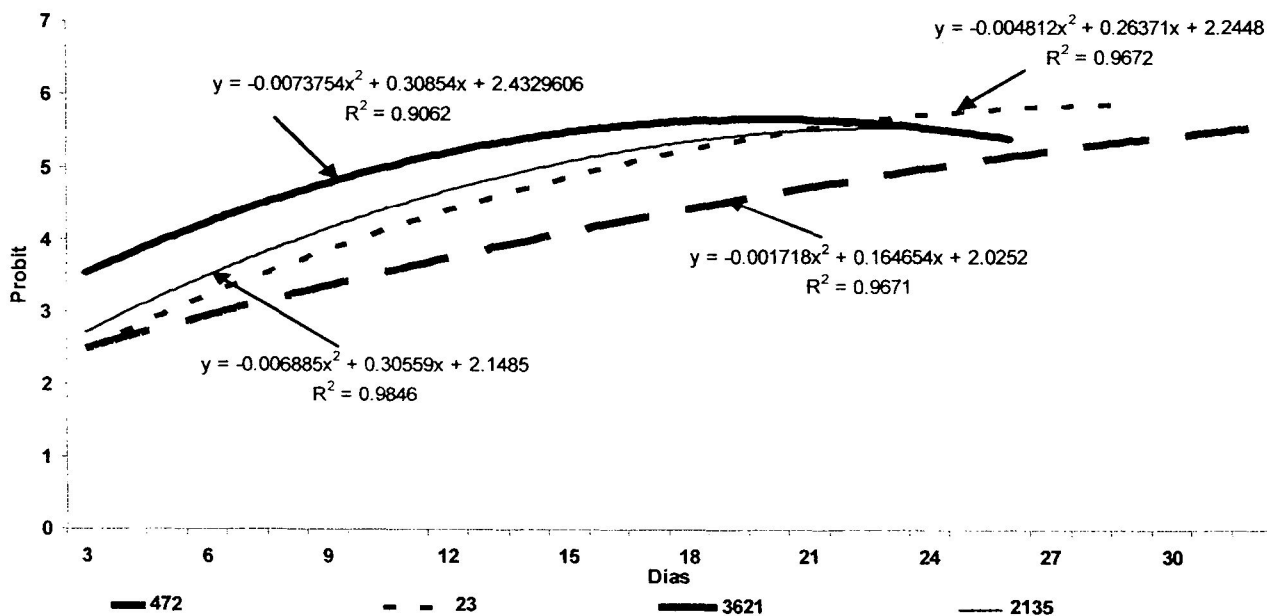


Figura 1. Tiempo Letal medio (TL₅₀) de mortalidad acumulada de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, primera fase, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.

Se observa que la virulencia de los aislamientos 472, 23, 3621, 2135 sobre las larvas de gusano alambre con respecto al tiempo que requirió cada uno de ellos para alcanzar el Tiempo Letal 50 (TL₅₀), fue variable; donde el aislamiento 3621 mostró ser el más virulento ya que alcanzó su TL₅₀ a los 11 días, el 2135 a los 13 días, el 23 lo alcanzó a los 14 días, y el 472 a los 24 días.

Las diferencias en cuanto a parasitismo no sólo dependen de las características de los aislamientos de *M. anisopliae*, sino también de la susceptibilidad del hospedante, por lo que las diferencias que se obtuvieron en cuanto a incidencia y TL₅₀ son el resultado de la interacción aislamiento de *M. anisopliae* - larva de gusano alambre.

7.1.6. Aislamiento, Caracterización morfológica y reproducción de aislamientos

Del inóculo utilizado al inicio del experimento y tomando de los insectos parasitados por los aislamientos 23, 472, 2135 y 3621, se tomó una muestra de conidios para reproducirlos, comparando así algunas características culturales morfológicas, con la finalidad de identificar a los materiales, por lo que se tomó en cuenta principalmente la coloración de la colonia de conidios (desarrollados en el medio de cultivo PDA + Extracto de Levadura), que es la característica más evidente de cada material, como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características culturales morfológicas de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* de mayor virulencia, desarrollados sobre el medio de cultivo PDA + Extracto de Levadura, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.

Aislamiento	Color de la colonia	Color de Conidios	*Tamaño de conidios largo / ancho
23	Blanca	Verde Olivo	5/2
472	Blanca	Verde grisáceo	5/2
2135	Blanca	Verde Oscuro	5/2
3621	Blanca	Verde Claro	5/2

* en μm , promedio de 30 conidios

En cuanto al tamaño de los conidios de las muestras analizadas de cada aislamiento, no se encontraron diferencias apreciables en cuanto al largo y ancho de los conidios (ver apéndice 5). El largo fue de 5 μm y el ancho de 2 μm (Apéndices 5 y 6). Además se inocularon juntos en el medio de cultivo PDA + Extracto de Levadura, el material aislado de la larva con el material inoculado inicialmente para cada uno de los aislamientos y se observó que estos al desarrollarse juntos en el medio de cultivo presentaron compatibilidad vegetativa. Con lo anterior, se determinó que correspondían a los materiales aplicados inicialmente. Así mismo se observó la sintomatología presentada en las larvas, con lo cual se determinó que la enfermedad (mortalidad de las larvas) estaba asociada al entomopatógeno *M. anisopliae*, como se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Sintomatología visible presentada a nivel general por las larvas de gusano alambre causada por la presencia de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.

Síntoma	Descripción
Cambios de conducta	Pérdida del apetito, movimientos débiles y descompasados, pérdida del reflejo de enderezamiento permaneciendo encorvadas.
Cambios en la estructura externa	Histólisis en diferentes regiones del insecto, observándose pequeñas secciones de color café oscuro o negro, dando un aspecto de descomposición, producto de la actividad enzimática. El cuerpo de las larvas presentó la característica de rigidez post-mortal del insecto que por lo general presentaba una posición encorvada y en algunos casos erecta.
Colonización	El micelio emergió de las aberturas naturales como la boca, el ano, otras partes como las regiones intersegmentales, tarsos y las áreas donde se presentaba la histólisis, cubriendo el cuerpo de la larva. La formación de anillos de conidios, que por lo general seguían el patrón de los segmentos abdominales (regiones intersegmentales) principalmente, pero que en muchos casos se observó un cubrimiento casi total de la larva. Presentándose el color característico de cada aislamiento.

7.2. Segunda fase

7.2.1. Patogenicidad de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae*

Una vez inoculadas las larvas con los aislamientos 23, 472, 2135 y 3621 se procedieron a realizar las lecturas de mortalidad diaria y acumulada cuyos resultados se muestran en el apéndice 7. Donde los resultados indicaron nuevamente que los aislamientos son patogénicos sobre gusano alambre.

7.2.2. Incidencia de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp

A los resultados de mortalidad de esta fase se les realizó el análisis de varianza (al 1% de significancia) con los datos normales en porcentaje, debido a que se cumplían los supuestos del modelo planteado (ver apéndice 8). En el cuadro 8 se muestra el resumen del análisis de varianza.

Cuadro 8. Resumen del análisis de varianza a los resultados de mortalidad de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr > F
Tratamiento	3	2275.16213050	758.38737683	14.18	0.0001
Error	16	855.93372764	53.49585798		
Total	19	3131.09585814			

C.V. = 8.23 %.

El análisis indica que los aislamientos poseen variabilidad en cuanto al grado de patogenicidad o virulencia visto desde de incidencia de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre el gusano alambre. El coeficiente de variación en esta fase fue del 8.23%. Debido a la diferencia altamente significativa de los aislamientos revigorizados en cuanto a la variable incidencia (% de Mortalidad), se realizó una prueba de medias con los resultados de mortalidad por medio de la prueba múltiple de medias de Tukey. Los resultados se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Resumen de la prueba de medias de Tukey de la mortalidad de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Aislamiento	% Mortalidad Media	Grupo Tukey
23	98.400	A
2135	93.846	A
3621	92.308	A
472	70.769	B

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

El análisis indica que los aislamientos 23, 2135 y 3621 son estadísticamente iguales, produciendo las mayores mortalidades sobre gusano alambre mientras que el aislamiento 472, mostró los menores resultados de los cuatro tratamientos evaluados, lo cual concuerda con las tendencias obtenidas en la primera fase, aunque es importante notar en esta segunda fase, la presencia a nivel general de una mayor virulencia respecto a la incidencia de *M. Anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp en relación con la primera fase. Esto se puede observar en inciso 7.2.5.

7.2.3. Determinación del TL₅₀ de los aislamientos revigorizados

Con los datos de mortalidad acumulada transformados a valores Probit, se establecieron las curvas características de mortalidad de los aislamientos revigorizados (ver apéndice 9) donde el modelo que más se ajusta a los datos es el cuadrático ($Y = b_2x^2 + b_1x + b_0$). En la Figura 2 se muestra el comportamiento de los tratamientos. Con respecto al Tiempo Letal 50 (TL₅₀), el aislamiento 23 en esta fase mostró ser el aislamiento más virulento ya que alcanzó su TL₅₀ a los 14 días, el aislamiento 3621 a los 16 días, el aislamiento 2135 a los 18 días y el aislamiento 472 lo alcanzó a los 24 días. En esto se observa que los aislamientos 23 y 472 alcanzaron su TL₅₀ en forma similar que en la primera fase, mientras que los aislamientos 2135 y 3621 lo alcanzaron 5 días después con respecto a la primera fase, lo cual podría atribuirse a la baja en la temperatura en los primeros días del experimento, donde se presentaron temperaturas entre los 22 y 24 °C (ver apéndice 10, fase 2), ya que una vez estabilizada la temperatura, por medio de la utilización de un calefactor, el comportamiento de los tratamientos volvió a presentarse en forma similar a la primera fase. Esto puede indicar que los aislamientos 8 y 10 resulten ser más susceptibles a los cambios de temperatura, mientras que los aislamientos 23 y 472, resultan ser un tanto más tolerantes, lo cual se considera una ventaja.

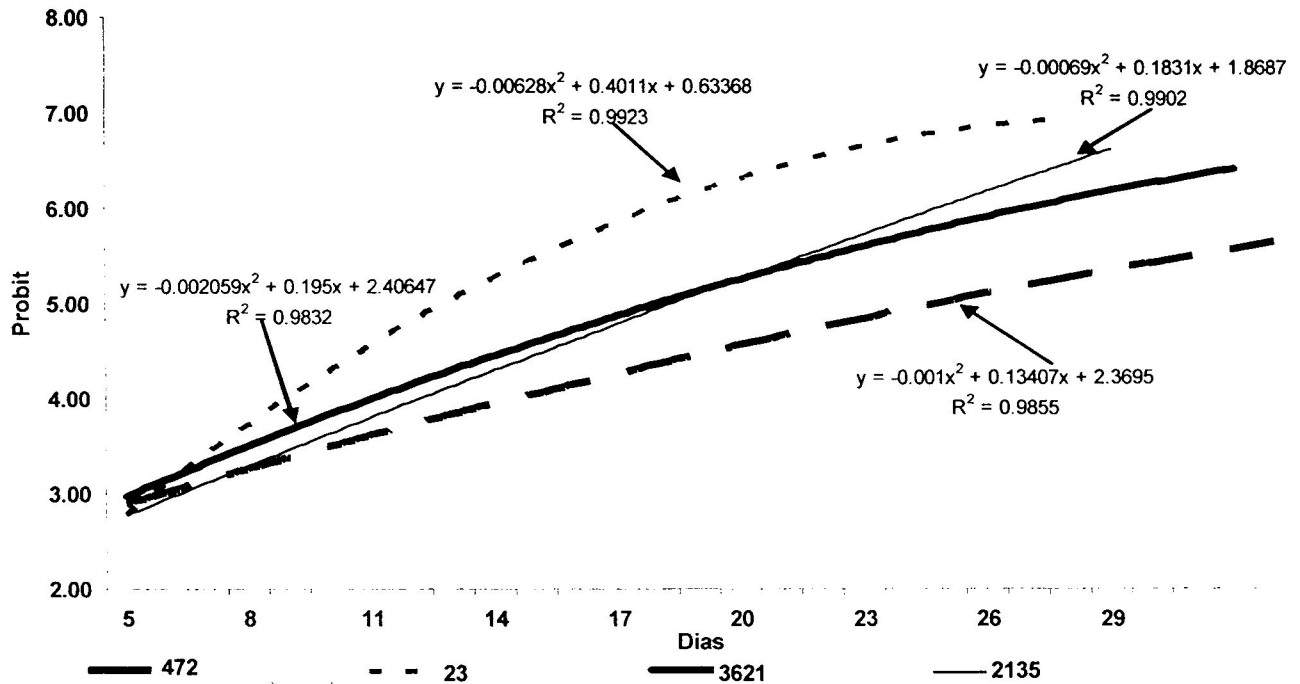


Figura 2. Curvas de tiempo-% de mortalidad acumulada de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla 2004.

Con relación al aumento de la mortalidad, cuando un aislamiento que se pasa por un insecto diferente al cual el aislamiento es originario, se produce porque *M. anisopliae* tienen enzimas que degradan la cutícula (amilasa, quitinasa y proteasa principalmente). Cuando el hongo es inoculado sobre un nuevo hospedante, tiene que activar su sistema enzimático para poder romper la tetracutícula, lo cual activa las enzimas, principalmente la quitinasa (aumentándose la concentración de estas en la F1), razón por la cual se vuelven patógenos y más virulentos, por lo que el aumento de estos factores una vez que se revigoriza el hongo en el hospedante es una de las consecuencias principales. Los resultados obtenidos pueden deberse a esta causa, al tipo de larva utilizada (alguna condición de su constitución por la época del año respecto a su susceptibilidad) así como a la variabilidad que se produce cuando se trabaja con bioensayos a causa de muchos factores que son diferentes entre bioensayos.

7.2.4. Efecto de la Revigorización

Se practicaron pruebas de t pareadas suponiendo varianzas iguales entre las dos fases de los aislamientos 23, 472, 2135 y 3621, los resultados se muestran en el apéndice 11. El análisis indica que para el aislamiento 472 no existe diferencia significativa entre las dos fases, mientras que para los aislamientos 23, 2135 y 3621 sí existe diferencia significativa entre las mortalidades de las dos fases, siendo mayores en la segunda fase. En la Figura 3, se puede observar que el aislamiento 472 en su segunda fase mostró solo un incremento del 3 %, mientras que el aislamiento 23

un 18 %, el aislamiento 2135 un 20 % y el aislamiento 3621 un 16 %, sobre la primera fase. El efecto en la mortalidad del gusano alambre podría asociarse a un efecto significativo en la respuesta a la revigorización de los materiales de *M. Anisopliae* sobre gusano alambre. Con respecto al Tiempo Letal Medio (TL₅₀) no se encontraron efectos significativos de la revigorización.

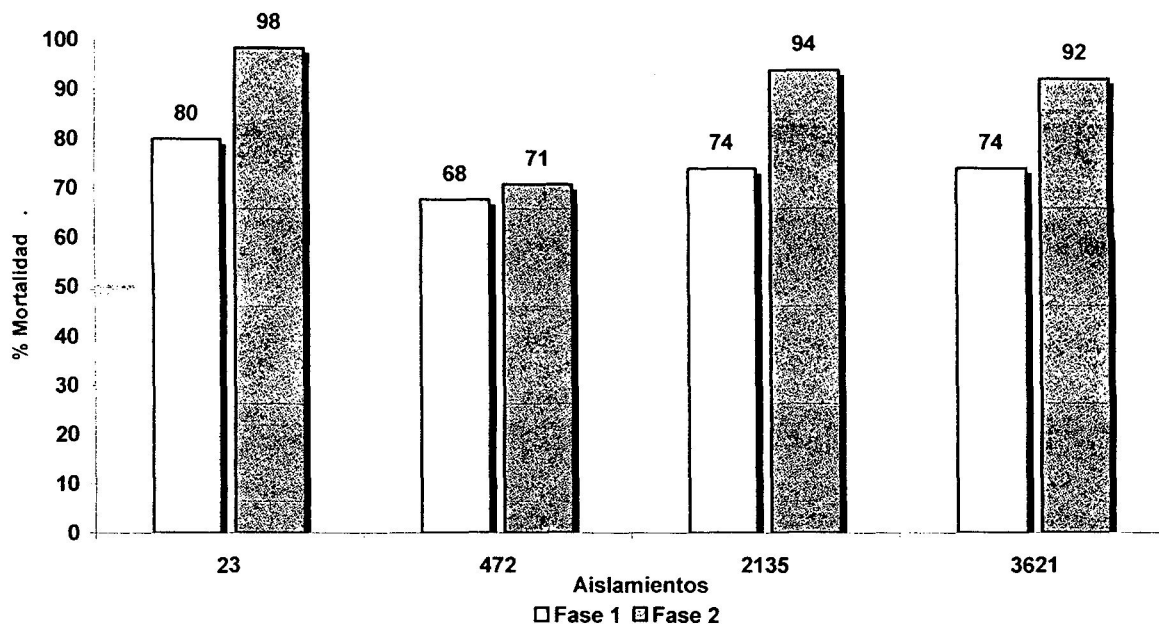


Figura 3. Comparación de las mortalidades de los aislamientos 23, 472, 3621, 2135 de la primera y segunda fase, en la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

7.2.5. Aislamiento, Caracterización morfológica y reproducción de aislamientos

Los hongos fueron aislados nuevamente de las larvas parasitadas y desarrollados sobre medio de cultivo PDA + Extracto de Levadura, corroborando las anotaciones hechas en los cuadros 7 y 8. Comprobando que los aislamientos obtenidos corresponden a los inoculados las veces anteriores y por lo tanto responsables de la muerte de las larvas en los diferentes tratamientos. En el apéndice 12 se presenta un resumen de todo el proceso de evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp.

8. CONCLUSIONES

1. Los 11 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* mostraron ser patogénicos sobre el gusano alambre, *Dipropus* spp., con grado variable de virulencia.
2. Los mayores índices de mortalidad (incidencia) fueron presentadas por los aislamientos 23 (80%), 472 (68 %), 2135 (74%) y 3621(74 %). Los aislamientos 346 y 2139 mostraron niveles de incidencia inferiores al 50%, mientras que los aislamientos 798, 1045, 977, 1859, 1897 mostraron valores inferiores al 10% mientras duró el ensayo.
3. Con respecto al TL_{50} en la primera fase, para los tratamientos altamente patogénicos, se observó que el aislamiento 3621 a los 11 días, muestra ser el aislamiento más virulento, seguido en orden decreciente de virulencia por los tratamientos 2135 a los 13 días, el 23 a los 14 días, y el 472 a los 24 días.
4. Contrario a lo planteado en la hipótesis, el aislamiento 1859 proveniente de *Conoderus*, no mostró tener capacidad patogénica significativa sobre *Dipropus* spp.
5. De los aislamientos revigorizados sobre gusano alambre, los que produjeron los mayores efectos sobre la incidencia, fueron los aislamientos 23, 2135 y 3621 con mortalidades de 98, 94 y 92 %, mientras que el aislamiento 472 un 71 %. Los TL_{50} de los aislamientos revigorizados indicaron que el aislamiento 23 resultó ser el más virulento con 14 días, seguido en orden decreciente de virulencia por el 3621 a los 16 días, el 2135 a los 18 días y 472 a los 24 días.
6. La revigorización de los aislamientos mostró efectos significativos en la incidencia de los aislamientos 23, 2135 y 3621 con incrementos del 18 al 20 %, mientras que el aislamiento 472 mostró un incremento del 3 % y aunque se consideró estadísticamente no significativo en comparación a los demás aislamientos, no deja de ser importante. Respecto al TL_{50} , no se encontró algún efecto significativo sobre esta variable por la revigorización de los aislamientos.

9. RECOMENDACIONES

Por los valores de mortalidad y TL_{50} , cuya importancia es poder seleccionar materiales que provoquen una alta mortalidad en el menor tiempo posible, los aislamientos de *M. anisopliae* 23, 3621, 2135 y 472 se consideran como materiales promisorios para el manejo del gusano alambre *Dipropus* spp. En el laboratorio, mostraron un alto potencial patogénico sobre gusano alambre, por lo que evaluaciones sobre dosificación medios de multiplicación, el diseño de diferentes prototipos de formulación, efectos colaterales con el ambiente y eficacia en invernadero y campo, se consideran importantes con la finalidad de determinar el aislamiento más efectivo sobre el gusano alambre en su hábitat natural.

Existen diferencias en cuanto a la virulencia entre diferentes cepas de una especie. Es importante evaluar el mayor número de cepas posibles, mediante bioensayos estandarizados, para detectar estas diferencias. Otros parámetros, como velocidad de crecimiento, intensidad de la esporulación, rapidez para invadir el hemocele del insecto, pueden ser considerados en futuras investigaciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrícola El Sol, GT. s.f. ACT'92. Guatemala. 1 p.
2. Agrios, GN. 1991. Fitopatología. 5 ed. México, Limusa. 756 p.
3. Alemán G, MA. 1997. Evaluación de nueve cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. para el control de la chinche salivosa (*Aeneolamia* spp., *Prosapia* sp.) bajo condiciones controladas. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 64 p.
4. Alexopoulos, C; Mims, C. 1979. Introductory mycology. 3 ed. NY, US, John Wiley. 325 p.
5. Alves, SB. *et al.* 1984. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.) Seitscheift fur Angewandte Entomologie 97:403-406.
6. Alves, SB. *et al.* 1986. Controle microbiano de insectos. Piracicaba, Brasil, Fundación de Estudios Agrarios Luiz de Queiroz / Manole. 424 p.
7. Astorga, A. 1992. Manual sobre el muestreo fitosanitario en caña de azúcar. Escuintla, Guatemala, Ingenio Santa Ana, Departamento de Investigación Agrícola. 43 p. (Serie de Estudios Técnicos. Documento 01).
8. Azañón, V. 1996. Evaluación de nueve cepas de *Metarhizium* sp. en el control de cuatro plagas insectiles de la caña de azúcar *Saccharum officinarum* a nivel de laboratorio. Tesis Ing. Agr. Guatemala, URL. 54 p.
9. Bernal, MG. *et al.* 1994. Virulencia de aislamientos de *Metarhizium* spp. y su eficiencia en campo sobre *Hypothenemus hampei*. Revista Colombiana de Entomología 20(4):225-228.
10. Badilla, F; Azañón, V; Morales, M. 2001. Evaluación de dosis del hongo *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumoso-roseus* para el control de adultos de chinche hedionda *Scaptocoris talpa* (hom. Cydnidae) a nivel de laboratorio. *In* Congreso nacional de la caña de azúcar (10., 2001, Guatemala); Simposio nacional de plagas (2., 2001, Guatemala). Memorias. Guatemala, ATAGUA. p. 23-35.
11. Badilla, F; Azañón, V; Solares, E. 1997. Evaluación de cuatro dosis del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin en adultos de *Aeneolamia postica* (homoptera: cercopidae) en el ingenio La Unión. Guatemala. *In* Congreso costarricense de entomología (4., 1997, Costa Rica). Resúmenes. Costa Rica. 92 p.
12. Badilla, F; Toledo, J; Barreno, C. 1998. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en adultos de *Aeneolamia albofasciata* (hom.: cercopidae) en el ingenio La Unión, Guatemala. Guatemala, Ingenio La Unión. 10 p.
13. Banco de Guatemala, GT. 2003. Informe de la política monetaria del banco de Guatemala a junio de 2003. Guatemala. p. 12-13.
14. Buenaventura, CE; Gómez, A. s.f. Control biológico de plagas. *In* Curso de entomología económica; programa para graduados en ciencias agrarias. Venezuela. 35 p.
15. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT). 2003. Informe anual 2002-2003. Guatemala. 75 p.
16. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT). 2003. Memoria: presentación de resultados de investigación; zafra 2002-2003. Guatemala. 177 p.

17. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT); CAÑAMIP (Comité Manejo Integrado de Plagas de la Caña de Azúcar, GT). 2000. Plagas de la raíz en caña de azúcar. Boletín CAÑAMIP no. 2:1-4.
18. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT); CAÑAMIP (Comité Manejo Integrado de Plagas de la Caña de Azúcar, GT). 2002. Simposio análisis de los resultados de la zafra 2001-2002 (7., 2002, Guatemala).Memorias. Guatemala. p. 4-6.
19. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT); CAÑAFER (Feria Cañera, GT). 2000. Memoria técnica: resúmenes de conferencias y minicursos. Guatemala. 46 p.
20. Devoto, L; Geraldin, M; France, A. 2003. Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtención de biopesticidas. Chile, Ministerio de Agricultura. 4 p.
21. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Departamento de Protección Vegetal. 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: estado actual y futuro. Honduras. 623 p.
22. France, A; Gerding, M; Gerding, M; Sandoval, A. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. In *Aegorhisnus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. Chile. Agricultura Técnica 60(3):205-215.
23. Garza, GR. 1983. Los gusanos de alambre como plagas del suelo. In Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo (1983, México). Chapingo, México, Sociedad Mexicana de Entomología. p. 40-60.
24. González, D; Albert, L. 2000. Contaminación por plaguicidas (en línea). México, CEPIS/OPS. Consultado 21 ago 2003. Disponible en <http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial2/e/unidad1/unidad1.ppt>
25. Greig, D. 1985. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha; manual de capacitación (en línea). Italia, FAO. Consultado 21 ago 2003. Disponible en <http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0037s/X0037S07.htm>
26. Guerrero, J; Mera, M; Salvo, H. 2000. Discriminación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con marcadores moleculares RAPD. Chile, Agro Sur 28(1):132-143.
27. Hill, DS. 1997. Agricultural entomology. Pórtland, Oregon, Timber Press. 570 p.
28. Ingenio La Unión, GT. 2003. Departamento de plagas y enfermedades: evaluación de 7 insecticidas para el control de gusano alambre. Escuintla, Guatemala. 1 p.
29. Ingenio La Unión, GT. 2003. Departamento de plagas y enfermedades: muestreo de plagas del suelo. Escuintla, Guatemala. 230 p.
30. Ingenio La Unión, GT. 2003. Departamento de plagas y enfermedades: reporte de muestreo, área aplicada con insecticida finca Río Azul. Escuintla, Guatemala. 1 p.
31. Lezama, GR. 1992. Biología y aplicación de los hongos entomopatógenos. In Curso de Control Biológico (3., 1992, México). Memorias. México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Agronomía. p. 166.
32. Luckmann, WH; Metcalf, RL. 1992. Introducción al manejo de plagas de insectos. México, Limusa. 710 p.
33. Macz, L. 1998. Evaluación de las fluctuaciones poblacionales, distribución vertical y disposición espacial de chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*), gallina ciega (*Phyllophaga* sp.) y gusano alambre (*Agriotes* sp. y *Conoderus* sp.) período 1995-1997, en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en finca El

Baúl, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 56 p.

34. Márquez, JM. 2001. Efecto de la mecanización sobre la población de plagas de la raíz en caña de azúcar y su estimación con diferentes tamaños de unidad de muestreo. *In* Congreso nacional de la caña de azúcar (10., 2001, Guatemala); Simposio nacional de plagas (2., 2001, Guatemala). Memorias. Guatemala, ATAGUA. p. 15-20.
35. Márquez, JM. 2001. Plagas de la raíz en caña de azúcar. *Revista AgriCultura* 4(43):16-18.
36. Marroquín, C. 1984. Evaluación del rango de hospedantes, medios de cultivo, luz y temperatura para la reproducción masiva del hongo entomopatógeno (*Metarhizium* spp.) *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 35 p.
37. Metcalf, C; Flint, W. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles; sus costumbres y su control. México, Continental. 1208 p.
38. Montepeque, R; Gómez, R; Hernández, A. 1996. Evaluación preliminar de *Metarhizium anisopliae* en *Agriotes* sp. (coleoptera: Elateridae) en condiciones de laboratorio. *In* Simposio nacional de plagas de la caña de azúcar (1., 1996, Guatemala). Guatemala, CAÑAMIP-ATAGUA. p. 2-9.
39. National Academy of Sciences, US. 1987. Control de plantas y animales; plantas nocivas y como combatirlas. México, Limusa. v. 2, 574 p.
40. Núñez, C. 1995. Evaluación de tres dosis del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, para el control de chinche salivosa (*Aeneolamia* sp.) en caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. en Siquinalá, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 74 p.
41. Plant Protection Research Unit, US, Plant, Soil and Nutrition Laboratory. 1992. Collection of entomopathogenic fungal cultures; catalog of strains. NY, US, Cornell University. 5 p.
42. Rodríguez, D. 1993. Hongos entomopatógenos. *In* Control biológico en Colombia: historia, avances y proyecciones. Colombia, Universidad Nacional de Colombia-Palmira. p. 30-42.
43. Rodríguez, SR; Rodríguez, JC; Riestra, D; Villanueva, JA.; Rodríguez, DA. 2002. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas* 64:34-40.
44. Rosales, FJ. 2001. Determinación de nivel de daño económico para el gusano alambre (*Agriotes* spp.) en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), finca Belén, Ingenio La Unión, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 50 p.
45. Sáenz, CE. 1989. Aplicación de *Metarhizium* spp PL-43 en Filadelfia, Guanacaste para el control de *Saccharosydne saccharivora* en *Aeneolamia* y *Prosapia*, 1988. *In* Congreso DIECA (2., 1989, Costa Rica). Memorias. Costa Rica, Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. p. 88-81.
46. Salguero, NV. 1998 El mip estrategia factible en caña de azúcar. Guatemala. *AgriCultura* 1(8):19-24.
47. Shannon, P. 1993. Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp. y *Beauverbia* spp. contra larvas de *Phyllophaga* spp. (coleoptera: scarabaeidae). Costa Rica, CATIE. p. 203-215.
48. Tejada, VH. 1993. Evaluación de cuatro unidades de muestreo, para estimar densidades de plagas del suelo en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Siquinalá, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 81 p.

49. Toledo, JC; Badilla, F. 1996. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en adultos de *Aeneolamia albofasciata* y *Prosapia* spp. en el ingenio La Unión, Guatemala. Guatemala, ATAGUA. p. 5-13.
50. Steel, RG; Torrie, JH. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. México. McGraw-Hill. 622 p.
51. Vargas, MR. 1999. Evaluación del efecto de cuatro sistemas de labranza en el nivel poblacional de chinche salivosa (*Aeneolamia* sp.), y producción, en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), finca Limones S.A., La Gomera, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 47 p.

vs. Bc Rolando Barrios

11. APÉNDICES

Apendice 1. Tiempo requerido para la esporulación sobre el 100% de la placa (10 cm de diámetro) y porcentaje de germinación de los diferentes aislamientos de *M. anisopliae* utilizando el medio de cultivo extracto de levadura a 26 °C con 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

Tratamiento	Tiempo en días	Porcentaje de germinación
1	7	95
2	6	100
3	7	100
4	7	90
5	6	90
6	7	100
7	6	100
8	6	100
9	7	90
10	6	95
11	6	95

Apendice 2. Resultados de mortalidad acumulada de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004. Primera fase.

DIAS	Trat 1	Trat 2	Trat 3	Trat 4	Trat 5	Trat 6	Trat 7	Trat 8	Trat 9	Trat 10	Trat 11	Trat 12
1	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00
3	1,54	0,00	3,08	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00
4	1,54	1,54	3,08	0,00	1,54	1,54	0,00	1,54	0,00	3,08	0,00	0,00
5	1,54	1,54	3,08	0,00	1,54	1,54	0,00	10,77	0,00	7,69	0,00	0,00
6	1,54	1,54	4,62	0,00	1,54	1,54	0,00	23,08	0,00	12,31	0,00	0,00
7	1,54	1,54	4,62	0,00	1,54	1,54	0,00	32,31	0,00	13,85	0,00	0,00
8	1,54	1,54	16,92	0,00	1,54	1,54	0,00	33,85	0,00	23,08	0,00	0,00
9	1,54	1,54	26,15	0,00	1,54	1,54	0,00	36,92	0,00	26,15	3,08	0,00
10	10,77	3,08	36,92	0,00	1,54	3,08	0,00	47,69	0,00	35,38	4,62	0,00
11	10,77	3,08	44,62	0,00	1,54	3,08	0,00	55,38	0,00	41,54	6,15	0,00
12	10,77	3,08	47,69	1,54	3,08	3,08	0,00	58,46	0,00	46,15	6,15	0,00
13	13,85	3,08	50,77	1,54	4,62	3,08	0,00	61,54	0,00	53,85	6,15	0,00
14	18,46	3,08	52,31	1,54	4,62	3,08	0,00	64,62	0,00	53,85	6,15	0,00
15	21,54	4,62	56,92	1,54	9,23	3,08	0,00	64,62	0,00	56,92	6,15	0,00
16	21,54	4,62	56,92	1,54	9,23	3,08	0,00	64,62	0,00	58,46	7,69	0,00
17	26,15	4,62	60,00	3,08	10,77	4,62	0,00	66,15	0,00	58,46	20,00	0,00
18	30,77	4,62	60,00	3,08	10,77	4,62	0,00	66,15	0,00	60,00	21,54	0,00
19	33,85	4,62	67,69	3,08	12,31	4,62	0,00	67,69	0,00	66,15	24,62	0,00
20	33,85	4,62	73,85	3,08	12,31	4,62	0,00	69,23	0,00	69,23	24,62	0,00
21	33,85	4,62	76,92	3,08	13,85	4,62	0,00	70,77	0,00	70,77	24,62	0,00
22	40,00	4,62	78,46	3,08	18,46	4,62	1,54	70,77	0,00	72,31	26,15	0,00
23	47,69	4,62	78,46	3,08	20,00	4,62	1,54	70,77	0,00	73,85	35,38	0,00
24	52,31	4,62	78,46	3,08	21,54	4,62	1,54	72,31	0,00	73,85	36,92	0,00
25	56,92	4,62	78,46	3,08	24,62	6,15	1,54	72,31	0,00	73,85	40,00	0,00
26	58,46	6,15	78,46	7,69	27,69	6,15	1,54	72,31	0,00	73,85	40,00	0,00
27	60,00	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	0,00	73,85	43,08	0,00
28	64,62	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
29	64,62	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
30	64,62	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
31	64,62	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
32	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
33	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	6,15	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
34	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
35	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
36	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
37	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
38	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
39	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00
40	67,69	6,15	80,00	7,69	29,23	7,69	1,54	73,85	1,54	73,85	43,08	0,00

Apendice 3. Análisis de los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas de la prueba de patogenicidad de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004. Primera fase.

a) Supuesto de Normalidad

Ho: $T_1 = T_2 = \dots T_n$ Los tratamientos tienen una distribución normal

Ha: $T_1 \neq T_2 \neq \dots T_n$ Los tratamientos no tienen una distribución normal

Prueba	Estadístico W	Pr < W
Shapiro-Wilks	0.974536	0.4897

Con un alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis de que los tratamientos tienen una distribución normal.

b) Supuesto de Homogeneidad de Varianzas

Ho: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots \sigma^2_n$ Existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Ha: $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \dots \sigma^2_n$ No existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Prueba	Estadístico X^2	Pr < X^2
Bartlett	20.469740625	0.0251100387

Con un alfa de 0.05 se rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianza entre tratamientos.

Por lo que se procedió a analizar los datos utilizando transformación de datos, por medio de angular o arcoseno, permitiendo que el supuestos Homogeneidad de varianzas se cumpliera, como se muestra a continuación:

c) Supuesto de Normalidad con datos transformados por arcoseno

Ho: $T_1 = T_2 = \dots T_n$ Los tratamientos tienen una distribución normal

Ha: $T_1 \neq T_2 \neq \dots T_n$ Los tratamientos no tienen una distribución normal

Prueba	Estadístico W	Pr < W
Shapiro-Wilks	0.967974	0.2818

Con un alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis nula ($Pr > 0.05$), por lo que se puede decir con un 95 % de confianza que los datos de mortalidad de los tratamientos transformados por arcoseno presentan una distribución normal.

d) Supuesto de Homogeneidad de Varianzas con datos transformados por arcoseno

Ho: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots \sigma^2_n$ Existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Ha: $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \dots \sigma^2_n$ No existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Prueba	Estadístico X^2	Pr < X^2
Bartlett	9.201068801	0.5131337894

Con un alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis nula ($Pr > 0.05$), por lo que se puede decir con un 95 % de confianza que los datos de mortalidad de los tratamientos transformados por arcoseno presentan homogeneidad de varianzas entre tratamientos.

Apéndice 4. Resumen de los análisis de regresión sobre la mortalidad de los 4 mejores aislamientos de *M. anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus spp* bajo condiciones controladas. Primera fase. Ingenio La Unión, Escuintla, 2004.

Aislamiento: 23

Fase: 1

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	29.0803431	14.5401715	354.303164	1.5279E-18
Residual	24	0.98493085	0.04103879		
Total	26	30.0652739			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 96.72$

Modelo: $Y = -0.004812X^2 + 0.26371X + 2.2448$

Aislamiento: 472

Fase: 1

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	24.9502814	12.4751407	397.503776	9.3883E-21
Residual	27	0.84736	0.0313837		
Total	29	25.7976413			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 96.71$

Modelo: $Y = -0.001718X^2 + 0.00164654X + 2.025$

Aislamiento: 2135

Fase: 1

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	17.1148968	8.55744838	610.051472	5.8028E-18
Residual	19	0.26652099	0.01402742		
Total	21	17.3814178			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 98.46$

Modelo: $Y = 0.006885X^2 + 0.30559X + 2.150$

Aislamiento: 3621

Fase: 1

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	9.72924516	4.86462258	101.413399	1.6189E-11
Residual	21	1.0073331	0.04796824		
Total	23	10.7365783			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 90.62$

Modelo: $Y = -0.0072754X^2 + 0.308546X + 2.433$

Apendice 5. Mediciones de largo y ancho de las muestras de conidios de los tratamientos 1 y 3, en la evaluación de la patogenicidad de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

No.	T1			T3		
	1	2	3	1	2	3
1	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.003
2	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
3	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
4	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
5	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
6	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
7	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
8	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
9	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
10	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
11	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
12	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.003	0.005 / 0.002
13	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
14	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
15	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
16	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
17	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
18	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
19	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
20	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.003	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
21	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
22	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
23	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
24	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
25	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.003	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
26	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
27	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
28	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
29	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
30	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002

Valor(mm) X 100 = micrometros

1 = Muestra tomada del material reproducido de las colonias madres.

2 = Muestra tomada del material aislado y reproducido de las larvas parasitadas de gusano alambre. (primera fase)

3 = Muestra tomada del material aislado y reproducido de las larvas parasitadas de gusano alambre. (segunda fase)

Apéndice 6. Mediciones de largo y ancho de las muestras de conidios de los tratamientos 1 y 3, en la evaluación de la patogenicidad de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

No.	T8			T10		
	1	2	3	1	2	3
1	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
2	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002
3	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
4	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
5	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
6	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
7	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
8	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
9	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
10	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
11	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
12	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
13	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
14	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
15	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
16	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
17	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
18	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
19	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
20	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
21	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002
22	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
23	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
24	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
25	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
26	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
27	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.006 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
28	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
29	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002
30	0.005 / 0.002	0.004 / 0.002	0.004 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002	0.005 / 0.002

Valor(mm) X 100 = micrometros

1 = Muestra tomada del material reproducido de las colonias madres.

2 = Muestra tomada del material aislado y reproducido de las larvas parasitadas de gusano alambre. (primera fase)

3 = Muestra tomada del material aislado y reproducido de las larvas parasitadas de gusano alambre. (segunda fase)

Apendice 7. Resultados de mortalidad acumulada de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus spp.* bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004. Segunda fase.

DIAS	Trat 1	Trat 3	Trat 8	Trat 10
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	1,54	0,00
4	1,54	0,00	1,54	0,00
5	3,08	0,00	4,62	1,54
6	4,62	1,54	7,69	1,54
7	4,62	3,08	12,31	1,54
8	6,15	4,62	12,31	6,15
9	6,15	9,23	20,00	10,77
10	7,69	16,92	23,08	10,77
11	7,69	24,62	26,15	10,77
12	9,23	30,77	35,38	13,85
13	9,23	41,54	40,00	13,85
14	15,38	49,23	43,08	21,54
15	18,46	60,00	47,69	29,23
16	20,00	64,62	50,77	38,46
17	26,15	76,92	50,77	43,08
18	32,31	81,54	55,38	46,15
19	36,92	89,23	56,92	52,31
20	40,00	90,77	60,00	61,54
21	44,62	92,31	66,15	64,62
22	46,15	92,31	69,23	67,69
23	46,15	92,31	75,38	76,92
24	53,85	93,85	83,08	83,08
25	55,38	93,85	86,15	86,15
26	60,00	93,85	87,69	87,69
27	63,08	96,92	90,77	90,77
28	63,08	96,92	90,77	92,31
29	66,15	98,46	90,77	93,85
30	66,15	98,46	92,31	93,85
31	69,23	98,46	92,31	93,85
32	70,77	98,46	92,31	93,85
33	70,77	98,46	92,31	93,85
34	70,77	98,46	92,31	93,85
35	70,77	98,46	92,31	93,85
36	70,77	98,46	92,31	93,85
37	70,77	98,46	92,31	93,85
38	70,77	98,46	92,31	93,85
39	70,77	98,46	92,31	93,85
40	70,77	98,46	92,31	93,85

Apendice 8. Análisis de los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas de la prueba de patogenicidad de los aislamientos revigorizados de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

a) Supuesto de Normalidad

Ho: $T1 = T2 = \dots Tn$ Los tratamientos tienen una distribución normal

Ha: $T1 \neq T2 \neq \dots Tn$ Los tratamientos no tienen una distribución normal

Prueba	Estadístico W	Pr < W
Shapiro-Wilks	0.9065	0.0570

Con un alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis nula ($Pr > 0.05$), por lo que se puede decir con un 95 % de confianza que los datos de mortalidad de los tratamientos transformadas por arcoseno presentan una distribución normal.

b) Supuesto de Homogeneidad de Varianzas

Ho: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots \sigma^2_n$ Existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Ha: $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \dots \sigma^2_n$ No existe homogeneidad de varianza entre tratamientos

Prueba	Estadístico X^2	Pr < X^2
Bartlett	6.7439	0.0805

Con un alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis nula ($Pr > 0.05$), por lo que se puede decir con un 95 % de confianza que los datos de mortalidad de los tratamientos presentan homogeneidad de varianzas entre tratamientos.

Apéndice 9. Resumen de los análisis de regresión sobre las mortalidad de los 4 aislamientos de *M. anisopliae* revigorizados sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones controladas. Segunda fase. Ingenio La Unión, Escuintla, 2004.

Aislamiento: 23

Fase: 2

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	39.5033624	19.7516812	1386.14357	5.0014E-23
Residual	21	0.2992369	0.01424938		
Total	23	39.8025993			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 99.24$

Modelo: $Y = -0.00628X^2 + 0.4011X + 0.63368$

Aislamiento: 472

Fase: 1 T1 f2

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	19.6367814	9.81839071	886.948733	1.1924E-24
Residual	26	0.28781614	0.01106985		
Total	28	19.9245975			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 98.55$

Modelo: $Y = -0.001X^2 + 0.13407X + 2.3695$

Aislamiento: 2135

Fase: 2

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	33.159725	16.5798625	1095.01095	9.4182E-23
Residual	22	0.33310806	0.01514128		
Total	24	33.4928331			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 99.02$

Modelo: $Y = -0.0069X^2 + 0.1831X + 1.8687$

Aislamiento: 3621

Fase: 2

F.V.	GL	S.C.	C.M.	F	Pr>F
Regresión	2	29.8949586	14.9474793	733.286705	6.3634E-23
Residual	25	0.50960556	0.02038422		
Total	27	30.4045642			

Ho: $b_1 = 0$

Ha: $b_2 \neq 0$

Discusión: $Pr>F$ ($Pr<0.01$, al 99 % de confianza), por lo tanto se rechaza la Ho.

Conclusión: si hay regresión. $R^2 = 98.32$

Modelo: $Y = -0.002059X^2 + 0.195X + 2.40647$

Apendice 10. Temperaturas diarias promedio en la evaluación de la patogenicidad de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Fase 1		Fase 2	
Temperatura en Centígrados		Temperatura en Centígrados	
1	26	1	22
2	25	2	23
3	26	3	24
4	26	4	22
5	28	5	23
6	26	6	22
7	24	7	22
8	26	8	22
9	27	9	22
10	28	10	22
11	26	11	22
12	25	12	20
13	26	13	22
14	27	14	22
15	26	15	24
16	27	16	25
17	27	17	26
18	26	18	25
19	26	19	26
20	25	20	26
21	26	21	26
22	26	22	25
23	26	23	26
24	26	24	26
25	26	25	26
26	26	26	26
27	26	27	26
28	26	28	26
29	26	29	26
30	25	30	25
31	25	31	24
32	26	32	25
33	26	33	25
34	25	34	26
35	26	35	26
36	26	36	26
37	26	37	26
Promedio	26	38	26
		39	26
		40	26
		Promedio	24

En la segunda fase en los primeros 15 días se registraron temperaturas mínimas entre 22 y 24 centígrados.

Apendice 11. Pruebas de t suponiendo varianzas iguales la prueba de patogenicidad de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* en la primera y segunda fase sobre gusano alambre *Dipropus* spp. bajo condiciones de laboratorio, Ingenio La Unión S.A., Escuintla, 2004.

Tratamiento 1 en la primera y segunda fase.

Variable	Fase 2	Fase 1
Media	70,77	67,69
Varianza	71,00	41,42
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	56,21	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,64888568	
P(T<=t) una cola	0,26729607	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
P(T<=t) dos colas	0,53459215	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600563	

Tratamiento 3 en la primera y segunda fase.

Variable	Fase 2	Fase 1
Media	98,4	80
Varianza	12,8	195,26
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	104,033136	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	2,85234453	
P(T<=t) una cola	0,01070089	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
P(T<=t) dos colas	0,02140177	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600563	

continua apéndice 11...

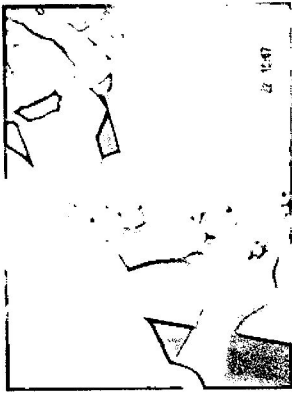
Tratamiento 8 en la primera y segunda fase.

<i>Variable</i>	<i>Fase 2</i>	<i>Fase 1</i>
Media	90,38	73,84
Varianza	133,14	47,34
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	84,1081995	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	2,68825017	
P(T<=t) una cola	0,0155823	
Valor crítico de t (una cola)	1,89457751	
P(T<=t) dos colas	0,03116461	
Valor crítico de t (dos colas)	2,36462256	

Tratamiento 10 en la primera y segunda fase.

<i>Variable</i>	<i>Fase 2</i>	<i>Fase 1</i>
Media	93,85	73,85
Varianza	11,83	165,68
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	88,7573964	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	3,35658557	
P(T<=t) una cola	0,00499112	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
P(T<=t) dos colas	0,00998223	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600563	

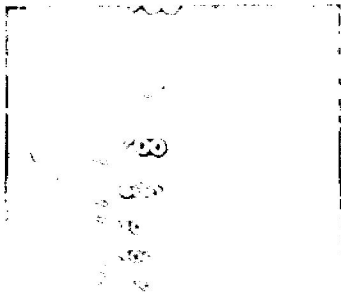
Apéndice 12. Resumen de la evaluación de la patogenicidad de los 11 aislamientos de *M. anisopliae* sobre gusano alambre *Dipropus* spp bajo condiciones controladas. Ingenio La Unión, Escuintla, 2004.



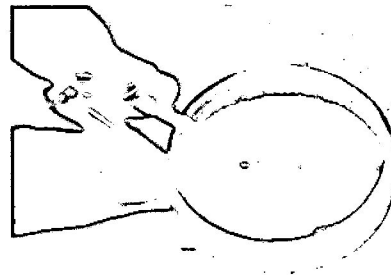
Obtención de los aislamientos



Selección de larvas de gusano alambre, colectadas en campo

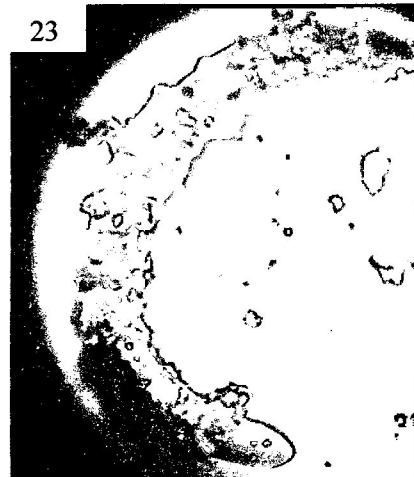


Inoculación de las larvas con conidios de *M. anisopliae*



Larva inoculada, en caja plástica con tierra estéril

Larvas de gusano alambre *Dipropus* spp parasitadas por los aislamientos de *M. anisopliae*



continuación apéndice 12....

2135



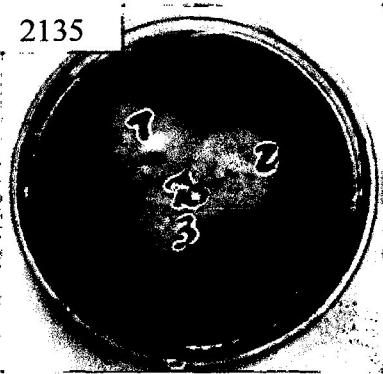
3621



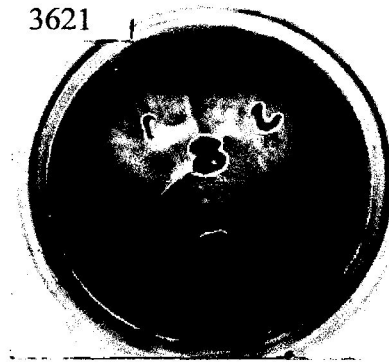
Desarrollo de los aislamientos 2135 (10) y 3621 (8) en sus tres fases mostrando compatibilidad vegetativa:

1. Inóculo inicial
2. Inóculo revigorizado (primera fase: primera inoculación y primer aislamiento sobre gusano alambre).
3. Inóculo revigorizado 2 (segunda fase: segunda inoculación y segundo aislamiento sobre gusano alambre).

2135



3621





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA -FAUSAC-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 37/2005

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE ONCE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. SOBRE GUSANO ALAMBRE *Dipropus* spp. (COLEOPTERA: ELATERIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

MARCO ROBERTO CANCINO AVALOS

CARNE:

9813458

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Alvarez Valenzuela
Ing. Agr. Samuel Guadalupe Córdova Calvillo

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Marco Vinicio Fernández Montoya
A S E S O R

Ing. Agr. Víctor Manuel Azañón Estacuy
A S E S O R

Dr. David Monterroso Salvatierra
DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE
Dr. Ariel Abdelramán Ortiz López
DECANO



DMS/nm
c.c. Archivo
IIA
Control Académico