

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

EFFECTO DE *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill.) Y *Metarhizium anisopliae* (Metch. Sorok.) CONTRA EL PICUDO NEGRO DE LA MUSACEAS (*Cosmopolites sordidus*)

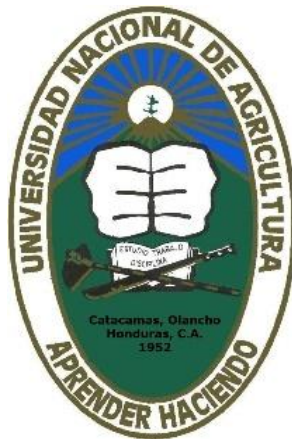
POR:

RAMON HEBERTO AVILA VELASQUEZ

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

EFEECTO DE *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill.) Y *Metarhizium anisopliae* (Metch. Sorok.) CONTRA EL PICUDO NEGRO DE LAS MUSACEAS (*Cosmopolites sordidus*)

POR:

RAMON HEBERTO AVILA VELASQUEZ

**Dr. ROY MENJIVAR.
Asesor Principal**

TESIS

**PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

DEDICATORIA

A DIOS por darme la oportunidad de terminar mis estudios con salud y fortaleza, por demostrar que su poder el hacer el bien no se determina por una doctrina ni mucho menos por un pensar.

A MI ABUELA MARÍA EVANGELINA DE VELÁSQUEZ (QDDG), por darnos su sacrificio y educación en todo momento en nuestras vidas, por los momentos más difíciles que enfrentamos como nietos y por todo su amor y cariño de madre que nos brindó, **A MI ABUELO JOSÉ ALBERTO VELÁSQUEZ** que junto a mi abuela nos brindaron su calor en todo momento, que al pensar en ella me hace sentir el amor más bello que tengo, y el dolor de su ausencia al no poder estar conmigo en este momento.

A MIS PADRES, PAULA EXCELIA VELASQUEZ Y JUAN ANGEL AVILA VILLIBOR, por cada momento de apoyo y por darme el voto de confianza para poder enderezar mi vida y sobre todo su paciencia, por cada lagrima que hice caer a mi madre y por cada decepción que hice tener a mi padre.

A MIS HERMANOS: SOBEYDA NINOSKA AVILA VELASQUEZ, NADIA ELEONORA AVILA VELASQUEZ, STALIN VLADIMIR AVILA VELASQUEZ, TANAIA LETICIA AVILA VELASQUEZ, ANGELA PAOLA AVILA VELASQUEZ que a pesar de nuestras diferencias, se antepone la sangre de nuestros progenitores.

AGRADECIMIENTOS

Total agradecimiento al DIOS supremo absoluto, por darme la oportunidad de terminar esta meta y la plenitud de poder aceptar su existencia en esta vida carnal y materialista.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA, por darme la oportunidad de estudiar y sobre todo lo aprendido en esta alma mater, jamás cambiaría la experiencia social y emocional que sentí en los cuatro años de estadía en ella; por ser la pionera en la educación pública superior del país considero de manera objetiva que es la mejor UNIVERSIDAD de Honduras.

A mi asesores de tesis Ph. D. Roy Menjivar, M. Sc. Héctor Fernández, M. Sc Raúl Muñoz por haberme permitido esta experiencia difícil para mi persona, pero a la vez feliz de poder haber realizado la misma.

Al asistente de laboratorio Saady Argeñal por su apoyo en todo momento en la realización del trabajo, a señora Irene que siempre fue comprensiva y alegre ante mi presencia en el laboratorio.

Al ingeniero Javier Reyes Luna, por sacarme de apuros en lo momento en que lo más lo necesitaba, a Mario Modesto Santos por ser un amigo fiel y especial, Héctor Enrique Díaz otro amigo sincero y que me dio su mano ante situaciones difíciles, a Carmen Meliza Peña Cinthia Irazema; Blas Enrique, Teddy Garcia, Pedro Ariel Chandias, al Modulo #1 y a mis amigos y hermanos de H-4 y a la clase ARMAGEDON, a todos mis amigos y amigas de toda la UNIVERSIDAD, todos forman parte de la estima y cariño que les tengo.

TABLA DE CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACION	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	2
2.1 General.....	2
2.2 Específicos	2
III. REVISION DE LITERATURA	3
3.1 Importancia de las plagas insectiles agrícolas.....	3
3.2 Descripción biológica y ecológica de <i>Cosmopolites sordidus</i>	4
3.2.1. Importancia	4
3.2.2. Ciclo de vida	4
3.2.3. Manejo químico y biológico	6
3.3 Hongos entomopatógenos	6
3.3.1 Descripción de <i>Beauveria bassiana</i>	7
3.3.2 Descripción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	9
3.4 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	10
3.4.1 Adhesión y germinación de la espóra en la cutícula del insecto	10
3.4.2 Penetración dentro del hemocèle	11
3.4.3 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto	11
IV. MATERIALES Y METODOS	13

4.1 Ubicación de la investigación	13
4.2 Materiales.....	13
4.3 Equipo	13
4.4 Manejo de equipo	14
4.4.1 Asepsia	14
4.4.2 Lavado	14
4.4.3 Esterilización	14
4.4.4 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)	15
4.5 Medios de Cultivos	15
4.5.1 PDA (papa dextrosa agar) MERCK y SDA (saboraud dextrosa agar) BIOTEC.	15
4.6 Aislamiento de los hongos entomopatógenos	16
4.6.1 Reproducción	16
4.6.2 Aislamiento directo	16
4.7 Evaluación de rendimiento y viabilidad	18
4.7.1 Rendimiento de conidias por ml de solución.....	18
4.7.2 Viabilidad	19
4.8 Inoculación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> a <i>Cosmopolites sordidus</i>	19
V. RESULTADOS Y DISCUSION	22
5.1 Determinación del mejor medio de cultivo	22
5.1.1 Rendimiento.....	22
5.1.2 Germinación.....	23
5.2 Mortalidad causada por las cepas evaluadas	24
5.3 Determinación de TL 50	26
5.4 Tiempo de colonización y número de insectos parasitados	29
VI. CONCLUSIONES	31
VII. RECOMENDACIONES	32
VIII. BIBLIOGRAFIA	33
XI. ANEXOS	38

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Descripción y dosificación de los tratamientos.....	20
Tabla 2. Tabla distribución espacial de los tratamientos.	21
Tabla 3. Concentración de conidias/ml suspensión obtenidos en los medios evaluados....	22
Tabla 4. Muerte diaria provocada por <i>B bassiana</i> H3 y <i>M anisopliae</i>	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de conidias/ml de suspensión de las cepas evaluadas en los medios evaluados.	23
Figura 2. Porcentaje de germinación diferentes medios evaluados, las letras iguales son la que comparación de la cepa en distinto medio de cultivo.	24
Figura 3 Numero diario de mortalidad acumulada de <i>C sordidus</i> , causadas por <i>B bassiana</i> <i>H3</i> y <i>M anisopliae</i>	25
Figura 4. Porcentaje diario de mortalidad acumulado de <i>C sordidus</i> , causadas por <i>B bassiana</i> <i>H3</i> y <i>M anisopliae</i>	26

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de ANAVA variable mortalidad.	39
Anexo 2. Estructuras reproductivas conidias y conidióforos de <i>M anisopliae</i>	39
Anexo 3. Reproducción de los hongos bajo condiciones de laboratorio	40

Avila Velasquez R. 2011. Efecto de *Beauveria bassiana* (Bals.Vuil.) y *Metarizium anisopliae* (Metch. Sorok.) sobre el picudo negro de las musáceas *Cosmopolites sordidus*. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras. 51 pp.

RESUMEN

Bajo condiciones de laboratorio de entomología de la Universidad Nacional de Agricultura, se realizó un estudio con el fin de determinar la patogenicidad de los hongos *Beauveria bassiana* H3 y *Metarhizium anisopliae*, sobre adultos de *Cosmopolites sordidus*. La cepa de *B. bassiana* se uso a una concentración de 1×10^9 conidios/ml y se extrajo de *C. sordidus* y la cepa de *M. anisopliae* se utilizo a una concentración de 1×10^{10} conidios/ml proveniente del instituto de agricultura organica (BATOVI) de Uruguay. Se utilizo un diseño experimental (DCA) con tres tratamientos (incluyendo el control) con cinco repeticiones; cada repetición estuvo representada por 10 insectos de *C. sordidus* colocados en el interior de una placa petri que contenía en el fondo papel toalla. Los insectos se sumergieron directamente en la soluciones por un periodo de 10 segundos extrayéndole posteriormente, colocándolos en las placas petris. Se realizaron observaciones diarias, cuando se encotron insectos muertos se colocaron inmediatamente en una cámara humeda (placa petri con papel toalla humedecido) con el fin de observar el tiempo de esporulación. Las variables evaluadas fueron mortalidad, esporulación, TL50. Los resultados indican que a los 8 días después de la inoculación la mortalidad ocasiona por los tratamientos fue: B.bassiana (90%), M. anisoplae (16%) y en el testigo (0%); A los 8 dias se observo únicamente B. bassiana ocasiono el 50% mortalidad a los 5 días (TL50) después de la exposición del insecto, la esporulación del hongo en el exterior del cuerpo del insectos infestados para B bassiana fue del 90 % y la mayoría de ellos lo hicieron al tercer día después de muertos y para *M. anisoplae* fue de 62.5% al cuarto dia. Se concluye que *B. bassiana* bajo condiciones de laboratorio tiene un alto potencial de control sobre *C. sordidus* , por lo que se recomienda realizar evaluaciones bajo diferentes dosis y condiciones de campo.

Palabras claves: Hongos entomopatogenos, Control biológico, S.D.A, P.D.A. Picudo negro de las musaceas

I. INTRODUCCION

La agricultura por su propia naturaleza es antiecológica y en parte con el uso y abuso de agroquímicos (incluidos los antibióticos) dirigidos contra plagas y enfermedades, se han originado profundas modificaciones biológicas, y esto se ha adjudicado a la toxicidad y/o amplio espectro de estos productos, lo que ha contribuido a una disminución de la biodiversidad y por tanto a una pobre regulación de las poblaciones macro y microbianas (Stefanova 1993). Además, el interés creciente sobre la salud humana, que ha conllevado a fuertes restricciones sobre el uso de plaguicidas químicos, ha hecho necesario implementar estrategias más saludables, insertadas en los sistemas de producción orgánica y sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), donde el uso del control biológico, con los bioplaguicidas microbianos incluidos, viene a ofrecer una solución viable (Claro 2006).

En la actualidad se conocen más de 1,500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas directamente; Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de plagas (Perez 1997).

Según Claro (2006) en su estudio determina que los productos bioplaguicidas representaron en el mercado el 2.5% del total de ventas de plaguicidas en el 2005, lo que representó 672 millones dolares. Se estimo que estos alcanzaron el 4.2% con un promedio de crecimiento de sus ventas de un 9.9% anual.

II OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar bajo condiciones de laboratorio, el efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos del picudo negro de las musáceas (*Cosmopolites sordidus*).

2.2 Específicos

Determinar el medio de cultivo, que permita un mejor desarrollo para los hongos entomopatógenos.

Evaluar la mortalidad que causan los aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, sobre *Cosmopolites sordidus*.

Determinar el tiempo letal medio (TL₅₀) de las concentraciones utilizadas

Determinar tiempo de colonización de los aislados entomopatógenos sobre *C. sordidus*

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 Importancia de las plagas insectiles agrícolas

Los insectos fitófagos ocasionan daños muy diversos a los vegetales, con frecuencia considerables, debidos a la alimentación o simplemente a que realizan la puesta de la cual nacerán inmaduros fitófagos (UNED, 2008). Algunos son gregarios, tienen tasas de reproducción explosivas y en poco tiempo invaden grandes extensiones de terreno, destruyendo en mayor o menor medida todos los ejemplares que encuentran, de modo que las pérdidas económicas que ocasionan suelen ser considerables.

Cuando nos referimos a pérdidas agrícolas reflejadas en el rendimiento, cabe de resaltar que no solo las plagas insectiles causan perdidas por sí solas, si no en conjunto con enfermedades y crecimiento de malezas para dar un porcentaje total del rendimiento esperado, al final se le atribuye a las plagas insectiles un 20% de las pérdidas totales, porcentaje que comparte con las enfermedades y competencia de malezas (Romeo 2004).

Los insectos que atacan a los brotes, pueden roerlos, producir deformaciones, formar agallas que impiden el crecimiento de la yema dañada, etc; los florícolas pueden alimentarse de estambres o llegar a roer todos los órganos de la flor, resultando entonces muy dañinos. Los que prefieren los frutos pueden excavar galerías profundas o producir lesiones más o menos superficiales. En troncos, tallos y ramas vivos, también pueden excavar distintos tipos de galerías (Toro 2003).

Pero las hojas constituyen la fuente principal e incluso exclusiva de alimento para muchos insectos, como son los cóccidos (homópteros) o las orugas de los lepidópteros, y suelen ser a parte más afectada del ejemplar. Algunos prefieren alimentarse del envés, otros del haz

algunas especies excavan galerías entre el haz y el envés, a medida que consumen el interior de la hoja, pero respetando la epidermis (UNED 2008).

Además pueden producir amplias erosiones o perforaciones en las hojas y roerlas total o parcialmente. Cuando éstas están iniciando el crecimiento, determinados insectos son responsables del desarrollo de unas estructuras llamadas agallas (UNED 2008).

3.2 Descripción biológica y ecológica de *Cosmopolites sordidus*

3.2.1. Importancia

El picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera: Curculionidae) es una plaga importante del banano, plátano (Gold y Messiaen 2000). El picudo adulto es negro y mide 10-15 mm vive libremente, aunque es más común encontrarlo entre las vainas foliares, en el suelo en la base de la mata o asociado con los residuos del cultivo. El picudo es activo de noche y muy susceptible a la desecación. Los adultos pueden permanecer en la misma mata por largos períodos de tiempo, y sólo una pequeña parte de ellos podrá moverse a una distancia mayor de 25 metros durante un período de 6 meses. Los picudos vuelan raramente, la diseminación ocurre principalmente a través del material de plantaciones infestadas (Gold y Messiaen 2000).

3.2.2. Ciclo de vida

El picudo negro del banano es un insecto seleccionado como la estrategia “k”, lo cual es c un prolongado período de vida y una baja fecundidad, muchos adultos viven un año,

mientras que algunos pueden sobrevivir hasta por cuatro años. En substratos húmedos, el picudo puede sobrevivir sin alimentarse durante varios meses. La tasa de machos y hembras es de 1:1. Se han registrado tasas de ovoposición de más de un huevo por día, pero más comúnmente, la ovoposición es estimada a un huevo por semana (Whalley 1958).

La hembra pone sus blancos huevos ovalados individualmente en los hoyos excavados por su pico. La mayoría de los huevos se ponen entre las vainas foliares y en la superficie del rizoma. Las plantas florecidas y los residuos de los cultivos son los lugares favoritos para la ovoposición (Gold y Messiaen 2000).

Las larvas emergentes se alimentan preferiblemente dentro del rizoma, pero también pueden atacar el tallo verdadero y, ocasionalmente, el seudotallo. Las larvas pasan a través de 5-8 etapas (Gold y Messiaen 2000).

La formación de la crisálida ocurre en células desnudas cerca de la superficie de la planta hospedera. (Gold y Messiaen 2000). Las tasas de desarrollo dependen de la temperatura, bajo condiciones tropicales, el período que le toma a un huevo convertirse en un picudo adulto es de 5-7 semanas.

Los adultos miden entre 10 a 15 mm de largo, son de color negro, con fuertes élitros y un pico pronunciado, debido a ello el nombre de Picudo negro. El adulto al inicio es marrón rojizo, pero con frecuencia se vuelve uniformemente negro. Cuando se deseca tiene aspecto grisáceo (Tazán 2003).

El desarrollo de los huevos no ocurre con temperaturas menores de 12 °C; este umbral puede explicar por qué es raro encontrar esta plaga a alturas mayores de 1600 m sobre el nivel de mar (Cardenas 1987).

3.2.3. Manejo químico y biológico

El control que se realiza en las plantaciones bananeras comerciales es principalmente químico, utilizando nematicidas con actividad insecticida e insecticidas específicos aplicados en la base de la mata (Gold y Messiaen 2000). Los insecticidas son de acción rápida y eficaz. Anteriormente se utilizaban ampliamente los insecticidas cyclodiénicos, pero eventualmente fueron abandonados debido al desarrollo de resistencia y a las implicaciones ambientales (Gold y Messiaen 2000).

Se encuentran disponibles organofosforados menos persistentes pero son más costosos y tóxicos para los manejadores y por lo tanto menos adecuados para los sistemas de producción a pequeña escala. Actualmente, el picudo negro del banano ha mostrado la habilidad de desarrollar resistencia a la mayoría de los químicos (Gold y Messiaen 2000).

El uso de los hongos entomopatógenos (por ejemplo, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control del picudo negro del banano ha sido estudiado desde los años 70, numerosas cepas han sido estudiadas con respecto a su actividad contra los picudos adultos y muchas de ellas producen la mortandad de más del 90%; sin embargo, pocos datos están disponibles sobre el desempeño de las cepas candidatas de los entomopatógenos bajo condiciones de campo. Por lo tanto, el desarrollo de los sistemas de entrega en los campos eficaces y rentables es probablemente el área más crítica de investigación en el presente (Coto 1996).

3.3 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos comprenden un grupo heterogéneo de más de 100 géneros, sin embargo, solamente un pequeño porcentaje de estos tienen que ser considerados por su potencial como agentes de control microbial; tomando en cuenta que algunos de estos géneros tienen un amplio espectro de hospederos y en muchos casos sus rangos geográficos

son también amplios, contamos entonces con una gran diversidad genética entre aislamientos de la misma especie de diferentes hospederos y localidades, por lo que es prioridad que en programas de control biológico y manejo integrado de plagas, se colecten, purifiquen y conserven estos microorganismos para tener opción a seleccionar aquellos más promisorios para usarse en programas de control biológico por incremento (Berlaga 2006).

Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidios y desarrollo miceliano. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo (Cañedo y Ames 2004).

En algunos casos, los micoplaguicidas aplicados actúan como agentes de control biológico clásico, reproduciéndose a niveles suficientemente altos para continuar causando mortalidad a niveles significativos por varios años, sin tener que repetir la aplicación. Éste es el caso, por ejemplo, con *Beauveria brongniartii* (Saccardo. Petch.), el cual fue aplicado en pastizales y huertos de Suiza para controlar al escarabajo *Melolontha melolontha*. Este hongo ha sido detectado en el suelo 14 años después de la aplicación (Enkerli *et al.* 2004), por lo que se creyó que contribuyó al éxito del producto en el control de la plaga (Zelger 1996).

3.3.1 Descripción de *Beauveria bassiana*

Es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycete, orden Moniliales, familia Moniliaceae (Alves 1986). Este hongo ha sido encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de mucha importancia agrícola (Alves 1986). Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café (*Hypothenemus hampei*), la palomilla del repollo, picudo del plátano

(*Cosmopolites sordidus*), así como el picudo de la chiltoma (*Anthonomus eugenii*). Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo (Alves 1986).

Según Barron, (2001), Carrillo (2005) , Kouassi, (2001) citado por Echeverría (2006), morfológicamente, *Bauveria bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 µm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de formas impodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis.

También Barron, (2006) citado por Echeverria (2006) afirma que las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas Kouassi, (2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano.

Según Arrastia s.f. citado por España (2010) *Beauveria bassiana* es un hongo que de manera natural, se localiza en el suelo, aunque se puede reproducir o cultivar en el laboratorio ya que es un hongo saprofito facultativo; su reproducción es asexual por conidios, presenta un micelio de color blanco cremoso quien produce las esporas: los insectos que atacan se tornan de color blanco o gris.

Según los estudios realizados por Arrastia s.f. demuestran que este patógeno se encuentra en la naturaleza siguiendo dos posibles ciclos de desarrollo, saprofitos en desechos vegetativos y parasitarios en insectos: el crecimiento saprofito puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo micelial.

Se ha determinado que unos de los metabolitos secundarios que ocasiona la muerte en *Beauveria bassiana* es el ácido oxálico, este compuesto ha sido descrito como uno de los

responsables en los la virulencia en los hongos entomopatogenos, y un elemento que coayugue la solubilizacion de la proteína cuticular (Diaz *et al.* 2005).

También se ha reportado compuestos tales como Beauvericina, que es un metabolito que ocasiones puede ser mortal a los mamíferos pero estos aislados de fusarium en trigo y maíz, también existen dos ciclotetrapeptidos muy parecidos denominados Beaverolidos H e I los cuales han sido aislados de *Beauveria spp* (Diaz *et al* 2005).

3.3.2 Descripcion de *Metarhizium anisopliae*

Al igual que *Beauveria. bassiana*, este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes,orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectosde diversos órdenes Alves (1986). Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia spp* y *Prosapia sp*), y chinches, plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Alves 1986).

En cuanto a metabolitos secundarios de *Metarhizium anisopliae*, son las llamadas destruxinas y las protodestruxina estas están relacionadas con la virulencia propias de este hongo entomopatogeno; las destruxinas son los compuestos mejor caracterizados, ya que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos, además también tiene la capacidad de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de malpighi, las dextruinas A,B,E poseen capacidad insecticida y que han sido probadas en *Plutella xylostella* (Diaz *et al.* 2005).

Para cada plaga en particular existen cepas específicas, las cuales se han venido seleccionando debido a la patogenicidad que tienen sobre la plaga, así como por sus características de producción. Por ejemplo para el control de la broca del café la cepa más

efectiva es Bb-114; para *Plutella* de repollo es la cepa Bb-38, para el control de picudo de chiltoma es la cepa Bb-64 y para el control de la salivita de caña, la cepa más efectiva es la cepa Ma-NB. (FUNICA, 2003) racimos con una cubierta mucilaginosa (Hall y Atskey, 1981).

3.4 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Según Tanada y Kaya (1993) citado por Cañedo y Ames (2004) La enfermedad producida por hongos se llama micosis, y ellos mencionan que el desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases.

3.4.1 Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto

Según Samson, *et. al* (1988). Describe un proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad el hospedante.

Los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden terminar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, pueden destruir a la hifa germinativa. En este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas (Samson *et al.* 1988).

3.4.2 Penetración dentro del hemocele

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo; además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifungosas y estado de desarrollo del insecto (Charnley, 1984). La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterasas y quitinasas).

Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto (Charnley 1984).

3.4.3 Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto

Tanada y Kaya, (1993) en su publicación citado por Cañedo y Ames (2004) describen que luego de que llega al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboideos, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante y produciendo micotoxinas. La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo; Las toxinas producidas juegan un rol muy importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. La muerte del insecto se produce con mayor rapidez cuando es afectado por un hongo entomopatógenos que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales.

Ferrón, describe en 1978, citado por Cañedo y Ames (2004), dice que el crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. Los hongos pueden producir sustancias antibacterianas que alteran la coloración del cadáver

Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica: el hongo crece en el hemocele formando masas micelianas que salen al exterior fundamentalmente por las regiones intersegmentales –esporulando sobre el cadáver y produciendo inóculo para infectar a otros insectos– y por las aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). La gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinación y esporulación fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90% (Ferron, 1978).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Ubicación de la investigación

El lugar donde se llevo a cabo la investigación fue en el Laboratorio de Hongos Entomopatogenos (L.H:E.), ubicado en la Universidad Nacional de Agricultura localizada a 6 Km de distancia de la ciudad de Catacamas Olancho, a una altitud de 350 msnm y una precipitación promedio anual de 1350 mm y una temperatura promedio de 28 C°.

4.2 Materiales

P.D.A. (Papa dextrosa agar)MERCK, SDA (saboraud destroxa agar) BIOTEC, bisturís, papel manila, mechero de alcohol, papel parafina, alcohol de quemar, mascarilla con filtro, fósforos, atomizador, agua destilada, porta objetos, azul de metilo, cubre objetos, jeringas de 5 y 1 ml, contómetro (contador manual de esporas), placas petri de100x15mm, ácido láctico, elenmeyer, beakers, tubos de ensayos, cámara de neuber, papel toalla, bisturis

4.3 Equipo

Cámara de flujo Laminar (biosafety class 2 labconco)

Auto claves (All america model 25x)

Micro- pipeta 5µl a 50 µl (Transferpette)

Calentadores (fisher Scientific.)

Refrigeradora

Microscopio (Meiji)

Estereoscopio (Meiji)

Cámara digital Canon

Cámara USB (motic 350)

Horno (Gallenkank)

4.4 Manejo de equipo

4.4.1 Asepsia

El LHE se sometió a procesos de limpieza general y desinfección, desde equipo e infraestructura; se utilizó como agente desinfectante el hipoclorito de sodio al 3.62 % concentración comercial, y este se disolvió hasta una concentración del 2 %.

4.4.2 Lavado

Se lavaron todos los materiales con agua destilada y detergente para remover cualquier residuo de materia orgánica, y luego se lavó con abundante agua para remover partículas del detergente.

4.4.3 Esterilización

Se esterilizó bajo dos métodos: la esterilización húmeda (Auto-clave) y esterilización con aire caliente (horno), la utilización de cada método dependió de los materiales a esterilizar.

La esterilización de los materiales y cristalería por calor húmedo o a presión de vapor de agua, se llevó a cabo con la ayuda de un autoclave, el cual se maneja a una presión de 2 atmósferas o 15 libras de presión hasta alcanzar a una temperatura de 121.6 °C a 124 °C, la cual se mantuvo durante un tiempo de 15 minutos; por lo general se esterilizan los medios de cultivo, platos petri, tubos de ensayo, papel toalla.

La Esterilización con aire seco se llevó a cabo con el horno y lo cual consistió con la entrada de aire y calentamiento del mismo, a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 a 20 minutos este método se utilizó para equipo como ser beakers, Erlenmeyer, pipetas.

4.4.4 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)

La desinfección a nivel de laboratorio se hizo de manera muy exigente para evitar contaminación de otro microorganismo del cual no se está sometiendo a estudio. Toda área en la cual se llevo a cabo el trabajo de aislamiento fue desinfectado con hipoclorito de sodio al 2%, llevando a cabo esta labor no más de 10 minutos y evitando aplicación lugares donde se encuentra inoculado el hongo entomopatógenos; esta labor se realizaba diariamente y se intensificaba cuando se realizaban aislados.

La cámara de aislamiento fue desinfectaba antes de cada aislamiento con alcohol al 70%, por dentro y afuera de la misma, se encendió el mechero y se mantuvo la cámara cerrada por termino de un minuto, el mechero se mantuvo encendido en todo el proceso de siembra, luego se procedió a realizar a cabo los aislamientos y siembra de las cepas evaluadas; la desinfección personal fue llevada a cabo siempre antes de de realizar aislamientos y después de los mismos, y consistió con la aplicación por aspersión a la manos con alcohol al 70%.

Como último paso para la desinfección fue la utilización de la luz ultravioleta tipo C, con el objetivo de eliminar cualquier contaminante que haya ingresado, al momento de realizar el aislamiento.

4.5 Medios de Cultivos

Se utilizo dos medios de cultivos los cuales se describirán a continuación

4.5.1 PDA (papa dextrosa agar) MERCK y SDA (saboraud dextrosa agar) BIOTEC

Se Pesaron 40 g de medio de cultivo P.D.A y 62 g de SDA cada producto en 1000 ml de agua esterilizada, luego se sometieron las soluciones en un calentador-agitador hasta que se

disolvieron completamente ; ya disueltas, se utilizó la técnica de siembra en tubos de ensayo, lo cual se vertió el medio en los tubos de ensayo y posteriormente fueron tapados o con algodón envuelto con tela de punto y masking tape para crear un tapon artesanal, luego se colocaron en forma ordenada en un elenmeyer de 500 ml y tapado con papel tapiz.

Dicho montaje se sometió al auto-clave hasta alcanzar 121°C a 14 psi de presión durante 15 minutos, cuando se termino la esterilización se procedió a trasladarlos a la cámara de flujo laminar donde se les dio una inclinación de manera que el medio pudiera cubrir una mayor área del tubo de ensayo, hasta que pudiera solidificarse y quedara listo para la siembra.

4.6 Aislamiento de los hongos entomopatógenos

4.6.1 Reproducción

Se realizo aislamiento a partir de insectos parasitados en *B. bassiana* cepa encontrada en los predios de la Universidad Nacional de Agricultura precisamente en los campos de musáceas de la sección de cultivos industriales, lo cual se utilizo la técnica de aislamiento directo que a continuación se describe.

En el caso de *M. anisopliae* procedente del instituto BATOVI de Uruguay, se utilizaron asilamientos provenientes del cepario del LHE-UNA.

4.6.2 Aislamiento directo

a) La técnica de aislamiento directo consistió en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo P.D.A. Esta técnica es muy desventajosa debido al grado de una segunda contaminación que el insecto posee de otros microorganismos. Por esta razón se realizo una desinfección externa del insecto con

hipoclorito de sodio al 2%, enjuagándose con agua destilada estéril, este tipo de aislamiento se realizó de la siguiente manera:

Se sumergió al insecto en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un tiempo de 20 segundos, luego se sumergió en ADE (agua destilada esterilizada) con una duración de 20 segundos, se repitió una vez más este último paso para asegurar la eliminación de moléculas del hipoclorito de sodio y se depositó en papel toalla para secarlo.

Al terminar el paso anterior se procedió a raspar con un asa bacteriológica las partículas del hongo en el insecto desinfectado, pasándola luego mediante la técnica de rayado a un medio de cultivo, se etiquetó debidamente cada plato

El cultivo que se utilizó para la siembra fue el P.D.A. acompañado con una dosis de 1cc de gentamicina / 1000 ml de solución de medio; el antibiótico se aplicó una vez ya esterilizado el medio y que su temperatura oscilaba en los 40° C, para evitar la inactivación del mismo, este antibiótico de amplio espectro, y su aplicación fue con el objetivo de evitar el crecimiento de bacterias en el medio y así favorecer el crecimiento de las cepas en estudio.

b) Reproducción a partir del aislamiento directo

Se escogieron los platos que presentaban mayor porcentaje de pureza los que se escogieron, etiquetándose como un F1, esta fue la fuente de inóculo. Las posteriores siembras, se etiquetaron como F2, a partir de estas se obtuvo la solución madre con la que se inocularon los *Cosmopolites sordidus*; el período de incubación de la F2 fue durante los 20 días siguientes, en el espacio de la cámara de cría del laboratorio, donde prevaleció una temperatura que estuvo entre 23 a 28°C.

4.7 Evaluación de rendimiento y viabilidad

4.7.1 Rendimiento de conidias / ml de solución

Se determino, la concentración de conidias por ml de solución a los 21 días después de la siembra del F2, realizando el conteo utilizando la cámara de Neubauer modificadas.

A partir de los cultivos puros, se preparo diluciones en serie de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del entomopatógeno, hasta que obtuvo una dilución que permitió realizar el conteo. Las diluciones se prepararon de la siguiente manera:

Colocamos un ml de la solución de 10 ml del cultivo puro en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril ADE con INEX 27.9 SL al 0.001%.

Se transfirió con una pipeta estéril un 1ml de la primera dilución a un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril con 0.001% de INEX 27.9 SL, éste se agito fuertemente durante un minuto, hasta que se logro obtener una tercera dilución de 10^{-3} de esta manera se procedió hasta que se encontró la dilución adecuada (10^{-4} , 10^{-5}), de la dilución que se selecciono, se tomo con una micropipeta la cantidad de 5µl de solución de 10^{-5} y se deposito en la cámara de Neubeaur.

El conteo de conidias se realizo a través del microscopio mediante un aumento de 40 X, se utilizando se el cuadro principal (c.p) central, el cual está dividido en 25 cuadrillos secundarios con la ayuda de un contometro se realizo el conteo, luego se calculo la cantidad de conidias / ml solución de la siguiente manera:

El número de conidias que se observaron en los cuadrados de la esquinas y del centro sacándose un promedio de los mismos, este valor multiplicado por el factor de cámara, dividido luego por el factor de dilución. El factor de cámara que se utilizo es de 10,000

por los cuadrados principales se recomienda la utilización de los cuadrados principales para esporas pequeñas, tales como *M anisopliae* y *B bassiana*.

$$N^{\circ} \text{ de conidias/g} = N^{\circ} \text{ de conidias/g de la cámara} \times \text{factor de la cámara} / \text{factor de dilución}$$

4.7.2 Viabilidad

Las cámaras de incubación fueron esterilizadas junto con los platos petri, junto con papel filtro y porta objeto, en el autoclave a 1.2 bares de presión y 121 C° por un tiempo de 20 minutos.

Se preparo el medio de cultivo (P.D.A) esterilizado en el auto clave, posteriormente con una pipeta pasteurs se deposito dos alícuotas de P.D.A. en un porta objeto a cada extremo del mismo, luego se procedió a depositar con una pipeta pasteur sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y se coloco el montaje en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel toalla humedecida esterilizada, con la finalidad de favorecer la germinación del entomopatogenos.

Los porta objetos inoculados se incubaron en un sitio de crecimiento a temperatura de un rango de 24 y 26 C°, dejándolos un tiempo de 20 horas, tiempo suficiente para determinar los porcentajes de germinación, posteriormente transcurrido el tiempo se realizo el montaje en un microscopio a un aumento de 40X, para poder observar la cantidad de esporas geminadas y no germinadas y así determinar los porcentajes de germinación de ambas cepas.

4.8 Inoculación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a *Cosmopolites sordidus*

Se preparo una solución de conidias para la inoculación de los picudos, la dosificación de *B bassiana* fue de 1×10^9 , y el caso de *M anisopliae* fue de 1×10^{10} (Tabla 1).

Tabla 1 Descripción y dosificación de los tratamientos.

Tratamiento	Dosificación
T1 (<i>Beauveria bassiana</i> H3)	1×10^9
T2 (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	1×10^{10}
T3 (Testigo) agua destila	0

Previamente a la inoculación se obtuvieron los *Cosmopolites sordidus* directamente del campo, realizando trampeos en las plantaciones aledañas a la Universidad Nacional de Agricultura, lo cual consistió en la colocación de trozos de pseudotallo de musáceas, partidos y dejados en el suelo, con el propósito de atraer a los picudos, que después de 10 días se procedió a capturarlos mismo tiempos después de puesto las trampas-.

Una vez obtenidos los picudos, se sometieron a una desinfección con hipoclorito de sodio al 0.2% durante un periodo de 10 segundos debido a la contaminación que poseían del campo, luego se colocaron en otro recipiente con agua ADE por un tiempo de 10 segundos, para la eliminación de moléculas de cloro y por último se colocaron en papel toalla para su secado.

Se vertieron 10 ml de ADE con INEX 27.9 SL al 0.001%, como surfactante para el desprendimiento de las conidias en los tubos de ensayo, esta es la solución madre que partió de la F2, de la cual se inoculo a los *Cosmopolites sordidus* .

La técnica de aplicación del inóculo fue la inmersión, la cual se colocaron los insectos en las soluciones de 10 ml de *B bassiana* a la dosis de 10^9 y de *M anisopliae* a la dosis de 10^{10} durante 10 segundos, se sumergieron un total de 50 picudos del banano por cada hongo en solución, dando por un total de 100 insectos inoculados mas los insectos del testigo

absoluto que este caso fueron 40, el testigo se sumergió a agua destilada y esterilizada durante un tiempo de 10 segundos.

Cada insecto fue colocado en platos petri con papel toalla y trozos de pseudotallo de musáceas como fuente alimenticia atractiva a los insectos, estos fueron etiquetados y ubicados en estantes de la sección de cámara de cría del LHE de la forma en que indica el DCA (Tabla 2) a una temperatura que oscilo de 23 a 28° C durante el periodo de evaluación de 8 días, y los cuales fueron expuestos a 12 horas luz y 12 horas de

oscuridad; se llevaron registros de mortalidad y parasitismo diarios haciendo conteos de los insectos vivos y muertos y observando el tiempo de esporulación dentro del insecto.

Tabla 2 Tabla distribución espacial de los tratamientos.

R1	R2	R3	R4	R5
T1	T3	T1	T1	T3
T2	T2	T3	T2	T2
T3	T1	T2	T 3	T 1

R= repetición.

Para observar el tiempo de colonización del hongo, se traslado cada insecto muerto a una cámara húmeda apuntando la fecha en que se encontró muerto el insecto, como también el tratamiento y repetición de procedencia, todo esto por razones de registros de muertes diarias y para brindarle las condiciones requeridas para que el hongo colonice, y se observo a diario con un estereoscopio su avance en el insecto mismo.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Determinación del mejor medio de cultivo

5.1.1 Rendimiento

En nuestra evaluación se busco determinar cuál es el mejor medio de cultivo para el crecimiento dentro de los datos a considerar para dicha determinación, fue la concentración de conidias/ml de solución y el porcentaje de germinación de cada cepa, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de conidias/ ml de suspensión obtenidos en dos medios evaluados.

Cepa	Nºconidias	Factor de disolución	Conidias/ml suspensión.
<i>Metarhizium anisopliae</i> P.D.A	122	1,E-04	1,22E+10
<i>Beauveria bassiana</i> H4 P.D.A.	89	1,E-04	8,90E+09
<i>Metarhizium anisopliae</i> S.D.A	112	1,E-04	1,12E+10
<i>Beauveria bassiana</i> H4 SDA	67	1,E-04	6,70E+09

Los resultados muestran que no existe diferencia significativa para poder determinar que medio de los evaluados presentó mayor concentración, para ambas cepas resulto las concentraciones muy similares.

En conversación personal con la MPSc. Agripina Gonzales encargada del proyecto de control biológico de la FHIA (Fondo Hondureño de Investigación Agrícola), comento que en su experiencia personal no ha encontrado una diferencia significativa en el rendimiento de conidias de *M anisopliae* en medios P.D.A y S.D.A .

Al final se observó que la cepa de *M anisopleae* presentó una concentración de $1, \text{E}+10$ en ambos medios de cultivo y *B bassiana* presentó una dosis de $1, \text{E}+9$ en ambos casos de medios de cultivo.

Según FUNICA s.f. esto refleja un rendimiento a según la comparación y recomendación que realiza ellos, donde la concentración de conidias mínimo en los hongos en la etapa de crecimiento en medios de cultivo, es de $1, \text{E}+8$, pero también manifiesta que la cepa de *Beauveria bassiana* refleja un mejor crecimiento a comparación de *M anisopleae*, caso contrario al que nos arrojó el conteo de las cepas evaluadas, indica que *M anisopleae* presenta un mejor rendimiento que *B bassiana* H3 en ambos medios evaluados (Figura 1).

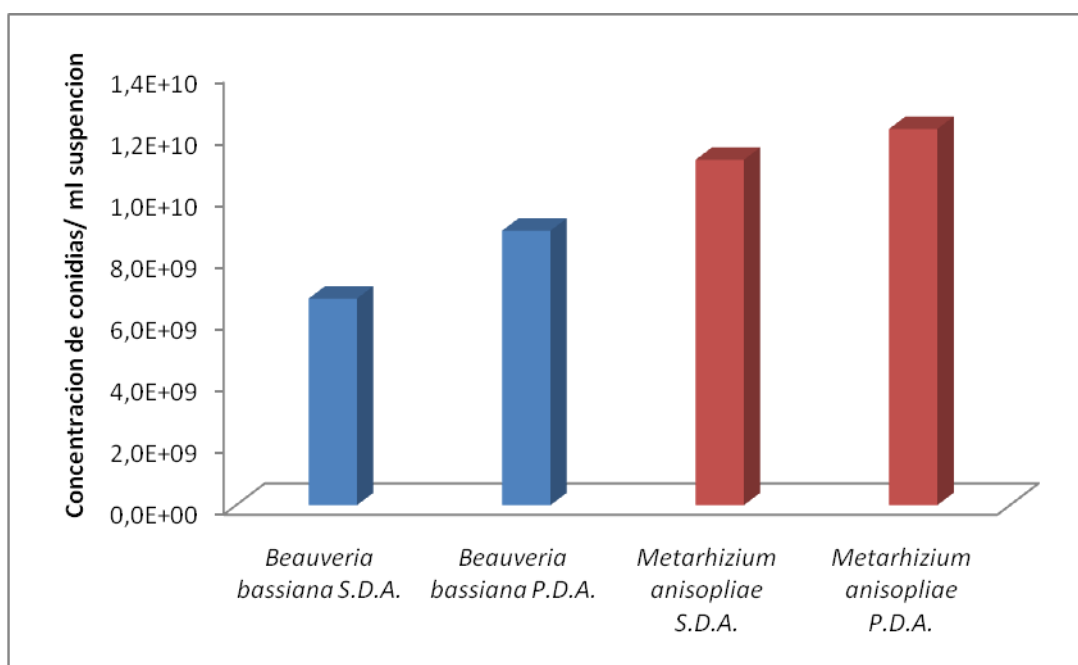


Figura 1. Concentración de conidias/ml de suspensión de las cepas evaluadas en los medios evaluados.

5.1.2 Germinación

Con respecto a esta variable no existió una diferencia significativa en el porcentaje de germinación de las cepas según el medio en el cual fue sembrado, presentando todos los

aislados en ambos medios germinación arriba del 85 %, (Figura 2) lo cual es indicador de buena germinación en el término de 20 horas.

En conversación personal con la M.P.Sc. Agripina Gonzalez manifiesta que en los procesos de reproducción y bioensayos el porcentaje de germinación, debe ser igual o mayor al 85% de con lo que se asegura una respuesta positiva en el aumento en la virulencia o crecimiento en sustratos.

Por lo tanto el medio de cultivo no hay diferencia significativa para su elección en cuanto a los medios evaluados P.D.A. y S.D.A. y queda a criterio del laboratorio su elección y esta dependerá de disponibilidad y costo de cada medio para su elección.

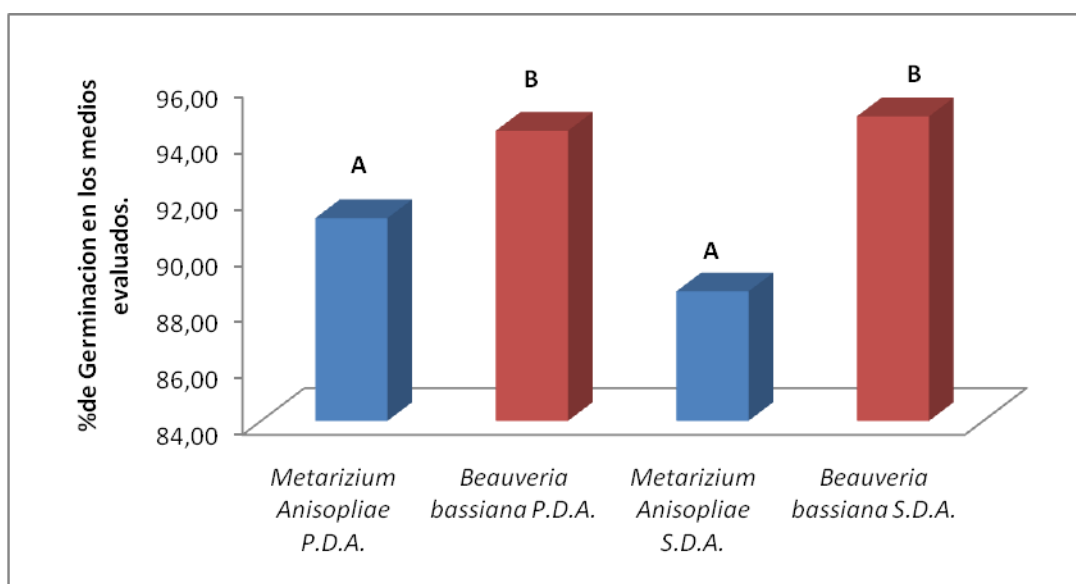


Figura 2. Porcentaje de germinación diferentes medios evaluados, las letras iguales son la que comparación de la cepa en distinto medio de cultivo.

5.2 Mortalidad causada por las cepas evaluadas

Se tomaron datos diarios en cuanto a la mortalidad de la cepa en relación con el tiempo se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 4 Muerte diaria provocada por *B bassiana* H3 y *M anisopliae* .

	Días								
Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	total
<i>Beauveria bassiana</i> H3	1	3	7	7	6	11	5	5	45
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1	1	2	0	0	1	3	0	8
Testigo (Agua)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

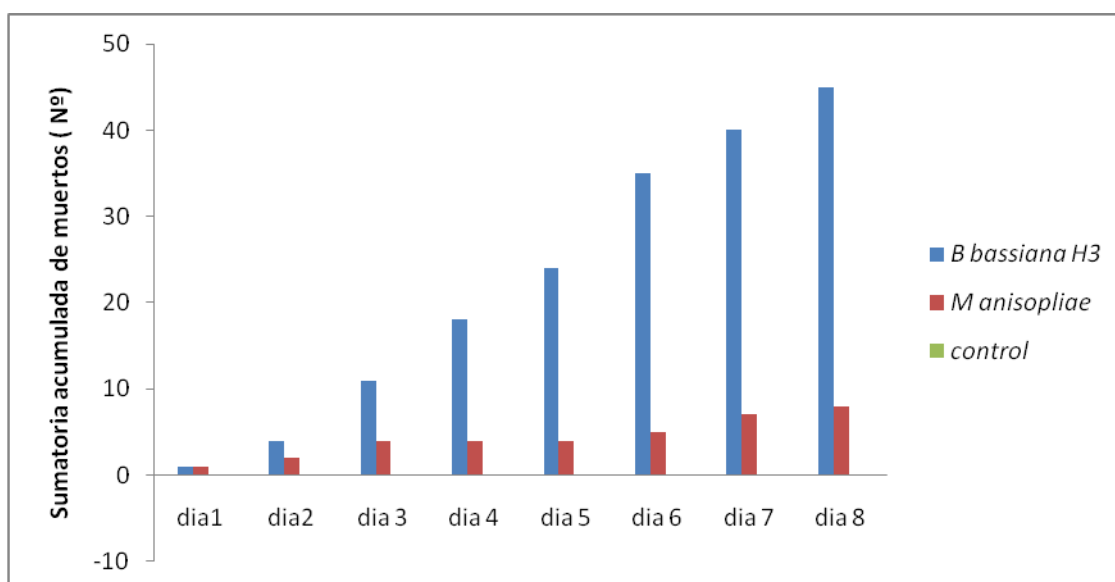


Figura 3 Numero diario de mortalidad acumulada de *C sordidus*, causadas por *B bassiana* H3 y *M anisopliae*

Para determinar si realmente existe significancia estadística en los tratamientos, se analizo el total de las muertes por HE, y se realizo un ANAVA en el programa estadístico infostad con una prueba de media de TUKEY con un grado del confianza de 0.95; los resultados son los siguientes:

El ANAVA nos arroja de que si hubo alta significancia en los tratamientos, y que por la media de TUKEY se determina que el T1 es el que causo un mejor control, por lo tanto la cepa *Beauveria bassiana* H3 tuvo el mejor control a comparación de *Metarhizium* y El testigo.

5.3 Determinación de TL 50

EL TL 50 solo se pudo determinar con la cepa de *Beauveria bassiana* H3 ya que *Metarhizium anisoplae* no alcanzo dicho porcentaje durante el tiempo de evaluación (Figura 4).

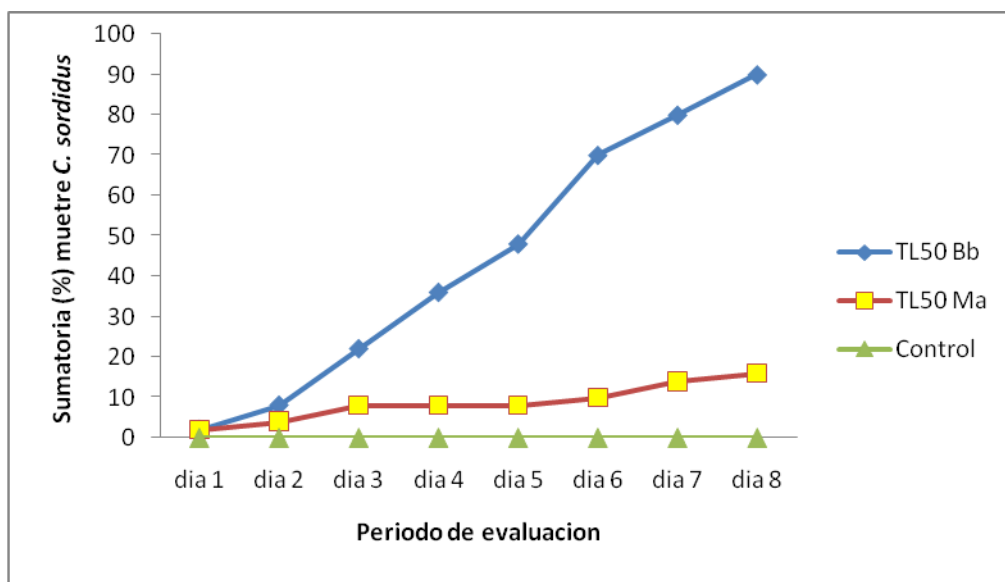


Figura 4. Porcentaje diario de mortalidad acumulado de *C. sordidus*, causadas por *B. bassiana* H3 y *M. anisoplae*

La cepa de *Beauveria bassiana* H3 se comporto con una virulencia fuerte en la relación de cantidad de insectos muertos por el tiempo al alcanzar el TL 50, la grafica refleja la cepa *B. bassiana* H3 alcanzo su TL50, en un tiempo de 5 días, mientras *M. anisoplae* simplemente causo un 16% de muertes en el periodo de evaluación.

Según Molina y Espinal (2,000) reportaron que las cepas aisladas de insectos del orden coleóptera presenta un mayor control en insectos del mismo orden, en este caso la cepa *Beauveria bassiana* H3 fue aislada de un coleóptero (*Cosmopolites sordidus*) encontrado en los campos de la UNA, las plantaciones de musáceas, y a la vez presento un porcentaje del 90% de control al mismo picudo negro, en el tiempo de evaluación de 8 días.

Esto puede explicar el bajo porcentaje de control de *Metarhizium* en *Cosmopolites sordidus*, ya que esta cepa no se realizó procesos de aislamiento o reavivamiento, aunque presentó un mayor rendimiento y un porcentaje de germinación mayor del 85 %.

Yeo y col., (2003); Altre y col., (1999) citados por Gomez (2009) mencionan que existe una correlación entre la tasa de germinación y la virulencia, esto quiere decir que el aumento de uno es el aumento del otro; situación que no ocurrió en el caso de *M. anisopliae*, ya que esta cepa presentó porcentajes de germinación del 90%, pero su nivel de virulencia fue el más bajo casi el 16%, lo que nos dice que esta condición de correlación está limitada a procesos anteriores, que se llevan a cabo en los mecanismos de acción y reproducción de los hongos entomopatógenos, procesos que pueden afectar síntesis de moléculas complejas como ser las enzimas encargadas de desdoblar la quitina para que el hongo penetre al hemocele y produzca los metabolitos secundarios encargados de la muerte del insecto.

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las proteínas por sus enlaces peptídicos, de acuerdo a su mecanismo de acción se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas; Las endoproteasas se han clasificado en familias con base en una comparación de los sitios activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional: serin proteasas (EC 3.4.21), cistein proteasas (EC 3.4.22), aspartil proteasas (EC 3.4.23) y metaloproteasas (EC 3.4.24) (Gomes 2009).

Se sabe que las proteínas constituyen entre el 60 a 70% de la cutícula de insecto. En consecuencia, las proteasas son los componentes más importantes que alteran la integridad de la cutícula por parte del hongo entomopatógeno (Charnley 2003).

Además según Tartar y Boucias, (2004) citado por Gomez (2009), las proteasas son utilizadas para destruir las proteínas antimicrobianas del hospedero, causar proteólisis en hemolinfa y la consecuente desnutrición de los hospederos y facilitar la activación proteolítica.

La proteasa Pr1 ha sido señalada como un factor de virulencia importante en *M. anisopliae*, (St Leger 2007). Además, se encontró que en *M. anisopliae*, las proteasas Pr1 activan la cascada de las profenoloxidasas, lo que aumenta la virulencia a través de la modificación del TL50 pero no de la CL50 (Fang 2005).

La inducción de las proteasas por el efecto de la presencia de la cutícula de los insectos en el medio de cultivo ha sido comprobada en *Beauveria bassiana* por diversos autores en medios de cultivo líquidos (Dias 2008; Donatti, 2008, Qazi y Khachatourians, 2007) y en cultivo en medio sólido (Barranco-Florido y col., 2002). La Pr1 es inducida en medio mínimo (Freimoser y col., 2005) y reprimida en medio solido artificial rico y en la hemolinfa de los insectos (St Leger y col. 1996). Mientras que la proteasa de tipo serina, Pr2, de *M. anisopliae* tiene poca actividad contra la cutícula del insecto (St Leger 1987) y es inducida por cualquier proteína cuando el hongo crece en un medio sin fuente de N mineral, ya que este ejerce represión sobre ésta.

En este caso de la poca virulencia por parte de *Metarhizium anisopliae*, fue probablemente a la constante reproducción y crecimiento en medio solido artificial rico, ya que esta condición fue la deprimente para el hongo, en la producción de enzimas proteasas desdobladoras de la cutícula del insecto.

Estas enzimas constituyen un factor de virulencia importante (St Leger y col. 1996) y sólo se requieren durante un corto periodo de tiempo en el momento de la penetración a la cutícula del hospedero para ser inhibida y el hongo realice procesos de producción de metabolitos secundarios para causar la muerte del insecto, su mayor producción se observa 40 horas después de la inoculación, es decir, durante la fase saprofita (Gomez 2009).

5.4 Tiempo de colonización y número de insectos parasitados

Esta variable se determino contabilizando el tiempo que tardo el insecto en desarrollar el micelio característico para cada cepa, por lo que se llevo a cabo un seguimiento una vez muerto el insecto, y este paro cuando se presentaron los primeros micelios colonizando al insecto.

La cepas evaluadas después de su muerte, el hongo debe de permanecer en una cámara húmeda y esta que posea una humedad relativa del 90% para favorecer el crecimiento del micelio; este tiempo se determino observando el insecto en el estereoscopio diariamente hasta que se observo el indicio del crecimiento del micelio.

Las cepa *Beauveria bassiana* H3 presento crecimiento del micelio al cabo de 3 días después de la muerte del insecto, mientras que *Metarhizium anisopliae* presento esta característica al cabo de 4 días después de la muerte del insecto.

En el caso de *Beauveria bassiana* H3 de un total de 45 insectos muertos, de los cuales 40 de ellos presentaron crecimiento micelial (90%) y en el caso de *M anisopliae* de un total de 8 muertos solamente 5 presentaron crecimiento de micelio; a los insectos que no presentaron crecimiento de micelio en su exterior, se procedió a realizar una incisión y observar a través del estereoscopio si hubo crecimiento interno; y todos presentaron crecimiento interno del hongo, Lo que nos asegura que el total de muertes de cada cepa fue causada por ellas.

Después de la muerte del insecto a causa de las micotoxinas, el hongo entra en una etapa facultativa dentro de la cual empieza el proceso de crecimiento del micelio; este proceso tarda entre 24 a 48 horas, según las condiciones que presente el medio, dentro de la cual favorezca el crecimiento del mismo (FUNICA 2003).

La humedad relativa dentro de las cámaras húmedas posiblemente inhibió en términos de horas el crecimiento del micelio en *C. sordidus* lo cual presenta un retraso de 24 horas a comparación a lo que la literatura expresa.

VI. CONCLUSIONES

La cepa *B bassiana* H3 presento un mejor control a *C sordidus* en cuanto a números de insectos muertos y el TL50.

La constante reproducción de *M anisopliae* en medio solido rico, pudo haber causado un deprimente de la síntesis de enzimas degradadoras de la cutícula del insecto.

No existe diferencia significativo en la elección del medio para la reproducción de las HE, queda a criterio del laboratorio la escogencia del medio a utilizar.

La correlación positiva en cuanto a germinación y virulencia queda limitada según los procesos metabólicos y de reproducción de los hongos entomopatogenos.

VII. RECOMENDACIONES

Se debe seguir afinado metodología en cuanto a la reproducción de las cepas que posee el LHE, ya que se presentaron problemas al momento de aislar las cepas, lo que contrajo demoras en la realización de la investigación.

Se deben de realizar mayor pruebas de patogenicidad en distintos órdenes o especies, siempre que se crea una metodología efectiva para la reproducción y obtención de los mismos.

Los suministros de insumos oportunos son fundamentales para futuras investigaciones, lo que contrae una mayor eficiencia en el tiempo dedicado o planificado para la investigación.

Para una futura producción comercial de HE, el LHE debe de poseer el equipo e infraestructura necesaria para una producción semi- Industrial, como el resolver el problema energético de manera que la producción no sea obstaculizada por recursos.

En futuro el LHE deberá especializarse con una cepa en específico para su producción semi-industrial, ya que una consecuencia de poseer varias cepas es la dificultad de obtener cultivos puros debido a la variedad de esporas de HE en el ambiente.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Altre JA, Vandenberg JD, Cantone FA. (1998) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 332-338.

Barranco-Florido JE. Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Verticillium lecanii* cultivado por fermentación en medio sólido. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2004.

Berlaga, A. 2006 Manejo y conservación de Hongos Entomopatógenos, Producción de Hongos Entomopatógenos, Centro Nacional de Referencia de Control biológico, Tecoman, Colima. México. 12 p.

Cardenas R; Arango, LG. 1987. Control del picudo negro *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) del plátano *Musa AAB* (Simmonds) mediante prácticas culturales. *Cenicafé*, 38:50-61.

Charnley, A. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: *Invertebrate-microbial interactions*. Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 229-270.

Charnley AK. (2003) Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40: 241-321.

Claro. O- 2006, Instituto de Investigacion de Sanidad Vegetal (INNISAV), La Habana Cuba, Metodos Artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatogenos y Antagonistas, 61 p.

Coto, D. 1996. El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) su reconocimiento y posible manejo. Hoja Técnica MIP no. 19. In Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 42:1-4.

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. (2008) Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 301-306.

Divanery Rodríguez Gómez 2009, “Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de *Beauveria Bassiana* (Bals.) vuill. y su mutante Resistente A 2-Desoxiglucosa”, Doctor en biotecnología, Iztapalapa, D. F.. 196 P. Mx.

Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro MHP, Furlaneto MC. (2008) Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. Current Microbiology, 56: 256–260.

Fang W, Leng B., Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied Environmental Microbiology, 71 (1): 363-370.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.

Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 258 p..

FUNICA)Fundacion para el Desarrollo Tecnologico Agropecuario y Forestal de Nicaragua. 2003 1ªEd, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomia, Revisado por Dr. Falguni, GUharay, CATIE, Nicaragua.

Gold, C. S. y Messiaen, S. 2000. El picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus*; Plagas de Musa. Hoja divulgativa no. 4. http://www.biodiversityinternational.com/Publications/pdf/696_ES.pdf, En Linea. Jun. 13.2011

Monzón, A.2001.Avances En El Fomento De Productos Fitosanitarios No-Sintéticos:Producción, Uso Y Control De Calidad De Hongos Entomopatogenos En Nicaragua.Manejo Integrado De Plagas En Costa Rica. No. 63 P . 9 5 - 1 0 3.

Perez, C.J. and Shelton, A.M. (1997) Resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America, *Journal of Economic Entomology*, 90, 87-93.

Qazi SS, Khachatourians GG. (2007) Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 48-59.

Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin. 80p.

Stefanova, M.; Sandoval, I. y Fernández-Larrea, O. (1993) Empleo de Biopreparados de *Trichoderma* en el Control de Hongos Fitopatógenos de Suelo en Tabaco, Pimiento y Tomate de Hidropónico. En: I Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, VIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica, Palacio de Convenciones, La Habana, Dic. 16-18.

St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. (1987) Production of cuticle degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. Journal of general Microbiology, 133: 1371-1382.

St Leger RJ. (2007) *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interaction. En: M Vurro and J Gressel (Eds.) Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, 179–204. Springer, Cap. 9.

St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. (1996b) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, 6354p.

Tanada, Y. And H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press, San Diego, California, USA: 666p.

Tartar A, Boucias DG. (2004) A pilot-scale expressed sequence tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed *in vivo*. Mycopathologia 158: 201–209.

Toro G.H., et al. 2003. Edicion Universitaria de Valparaiso, Universidad Catolica, Chile, Biologia de insectos, 42p.

Whalley Pes. 1958. An account of the weevil larvae bred from the banana plant in Uganda, with a description of the larva of *Temnoschoite nigroplagiata* (Qued.) (Coleoptera: Curculionidae). Bulletin of Entomological Research 631 p.

Yeo H, Pell JK, Alderson PG. (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science, 59 (2): 156-165.

IX. ANEXOS

Anexo 1 Cuadro de ANAVA variable mortalidad.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VAR R	15	0,92	0,90	35,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	223,33	2	111,67	67,00	<0,0001	
TRAT	223,33	2	111,67	67,00	<0,0001	**
Error	20,00	12	1,67			
Total	243,33	14				

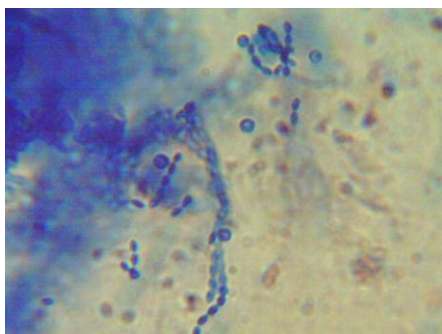
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,17830

Error: 1,6667 gl: 12

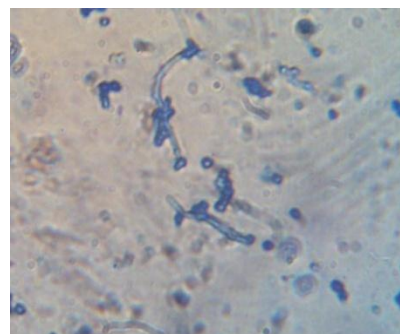
TRAT	Medias	n	E.E.	
3	0,00	5	0,58	A
2	2,00	5	0,58	A
1	9,00	5	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

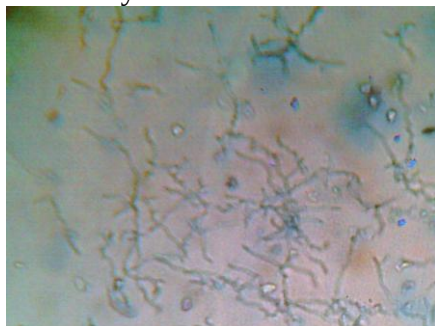
Anexo 2. Estructuras reproductivas conidias y conidióforos de *M anisopliae* y *B. bassiana*



Conidias y conidioforos de *M anisopliae*



b) Conidias y conidioforos de *B. bassiana*



c) conidias germinadas y no germinadas

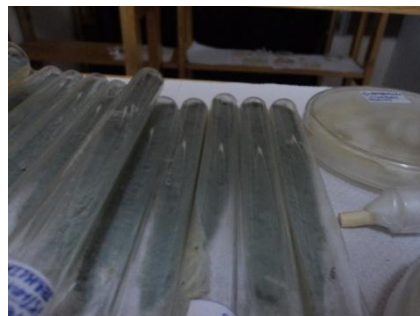


d) micelio en el interior del insecto

Anexo 3. Reproducción de los hongos bajo condiciones de laboratorio



a) Tubos de ensayo con *B. bassiana*



b) Tubos de ensayo con *M. anisoplae*



c) *C. sordidus* en cámara húmeda



d) *C. sordidus* en platos petri