

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin. PARA EL CONTROL DE CHISAS *Astaena sp* (Coleóptera: Scarabaeidae) EN NARIÑO

**HÉCTOR HENAO LEIVA
WILLIAM TOLOSA MONTAÑO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLA
PROGRAMA INGENIERIA AGRONÓMICA
PASTO-COLOMBIA
2004**

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin. PARA EL CONTROL DE CHISAS *Astaena sp* (Coleóptera: Scarabaeidae) EN NARIÑO

**HÉCTOR HENAO LEIVA
WILLIAM TOLOSA MONTAÑO**

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
INGENIERO AGRONOMO**

**Presidente de tesis
CLAUDIA SALAZAR G. I.A. M. Sc**

**Coopresidente
LUIS ALBERTO PEÑA I.A. M. Sc**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLA
PROGRAMA INGENIERIA AGRONÓMICA
PASTO-COLOMBIA
2004**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son de responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º del acuerdo N°. 323 de Octubre 11 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

VoBo. Claudia Salazar Gonzáles

Carlos Betancourth

Benjamín Sañudo

Armando Ramos

San Juan de Pasto, Febrero de 2004

DEDICATORIA

DEDICO A:

DIOS
MIS PADRES ALFONSO Y ERNESTINA
MIS HERMANOS ALONSO Y MIGUEL
YESSICA YADIRA
MI HIJO ANDRES FELIPE
MIS AMIGOS

WILLIAM TOLOSA MONTAÑO.

DEDICO A;

DIOS
MI MADRE MARIA EUGENIA
MIS HERMANOS DIANA, MARTHA,
JUAN Y ALEJANDRA
CARMEN ALICIA
MIS AMIGOS

LOS QUE CREYERON EN MI Y ME DIERON SU
APOYO

HECTOR HENAO LEIVA.

AGRADECIMIENTOS

CLAUDIA SALAZAR I.A. M. Sc. Docente de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

TITO ROLANDO BACCA I.A. M. Sc. Docente de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

LUIS ALFONSO MUÑOZ. INGENIERO AGRONOMO.

CARLOS BECANCOURTH I.A M Sc. Docente de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

ANI MERCEDES LUCERO MAFLA B. M. Sc. Investigadora CORPOICA

BENJAMÍN SANUDO SOTELO I.A. Docente de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

GERMAN ARTEAGA I.A. M. Sc. Decano de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

ARMANDO RAMOS I.A. M. Sc. Ex docente de la facultad de ciencias agrícola, Universidad de Nariño.

LUIS ALBERTO PEÑA I.A M Sc. Investigador CORPOICA

CORPOICA "Obonuco" Centró de investigación en Pasto

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización y culminación del presente trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO TEORICO	23
1.1 GENERALIDADES DE LAS CHISAS	23
1.2 CICLO BIOLÓGICO	23
1.2.1 Huevo	23
1.2.2 Larvas	23
1.2.3 Pupas	23
1.2.4 Clasificación taxonómica	24
1.2.5 Distribución	24
1.2.6 Daños	24
1.2.7 Hospedantes	25
1.3 CONTROL Y MANEJO	25
1.3.1 Control biológico	25
1.3.2 Control físico	34
1.3.3 Control químico	35
2. DISEÑO METODOLOGICO	36
2.1 LOCALIZACIÓN	36
2.2 FASE DE LABORATORIO	36
2.2.1 Aislamiento y purificación de las cepas	36
2.2.2 Preselección de las cepas	37
2.2.3 Prueba de patogenicidad	38
2.2.4 Diseño experimental en laboratorio	40
2.3 FASE DE INVERNADERO	42
2.3.1 Ensayo preliminar de sustrato para el establecimiento de larvas de <i>Astaena</i> sp en invernadero	42
2.3.2 Prueba de patogenicidad en invernadero	42

2.3.3	Diseño experimental	42
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1	FASE DE LABORATORIO	44
3.1.1	Preselección de las cepas aisladas	44
3.1.2	Prueba de patogenicidad (Análisis de varianza)	45
3.1.3	Determinación de la CL ₅₀ en laboratorio	48
3.2	FASE DE INVERNADERO	50
3.1.4	Ensayo preliminar de sustrato para el establecimiento de larvas de <i>Astaena sp</i> en invernadero	50
3.1.5	Prueba de patogenicidad (Análisis de varianza)	51
4.	CONCLUSIONES	54
5.	RECOMENDACIONES	55
	BIBLIOGRAFIA	56
	ANEXOS	59

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Costos de producción de entomopatógenos (botella de 750 g.).	28
Cuadro 2. Costos para la construcción y uso de una trampa de luz.	35
Cuadro 3. Procedencia de las cepas de entomopatógenos utilizadas para la preselección en laboratorio.	37
Cuadro 4. Cepas seleccionadas para la prueba de patogenicidad en larvas de <i>Astaena sp</i> en la fase de laboratorio.	38

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Trampa de luz y fosa donde caen los adultos	34
Figura 2. Cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizadas en el ensayo para el control de larvas de <i>Astaena sp</i>	38
Figura 3. Unidad experimental para la prueba de patogenicidad en laboratorio para el control de larvas de <i>Astaena sp</i> con cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	40
Figura 4. Cría masiva en botellas de las cepas Ma. 1, Ma. 4, Bb. Cosmo, Bb. 14 para el control de larvas de <i>Astaena sp</i> con cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	41
Figura 5. Ensayo preliminar para la selección de cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	44
Figura 6. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	46
Figura 7. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de seis concentraciones en dos cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	47
Figura 8. Porcentajes de mortalidad de la interacción de seis concentraciones de dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	48
Figura 9. Dosis letal media determinadas para dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	49
Figura 10. Tratamientos seleccionados para la fase de invernadero (mortalidad > 80%), Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera.	50

Scarabaeoidea).

Figura 11. Ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* en la fase de invernadero. 51

Figura 12. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de ocho tratamientos de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill y cepas *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin. Para el control de *Astaena sp* (Coleoptera. Scarabaeoidea) en condiciones de invernadero 52

Figura 13. Larvas de *Astaena sp* afectadas por la cepa *Beauveria bassiana* 14, en prueba de patogenicidad en condiciones de invernadero 53

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Mortalidad obtenida con cuatro cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y una de <i>Metarhizium anisopliae</i> en chisas de <i>Astaena sp.</i>	60
Anexo B. Análisis de varianza para la evaluación de cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	61
Anexo C. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	62
Anexo D. Porcentaje de mortalidad obtenidos en la evaluación de 6 concentraciones de dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	63
Anexo E. Porcentaje de mortalidad de la interacción de seis concentraciones de dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	64
Anexo F. Dosis letal 50 calculadas por medio del análisis probit para dos cepas <i>Beauveria bassiana</i> (Bals). Vuill y dos cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (metch) Sorokin. Para le control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae) en condiciones de laboratorio.	65
Anexo G. Tratamientos seleccionados para la fase de invernadero (mortalidad > 80%) para el control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae).	66
Anexo H. Ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de <i>Astaena sp</i> en la fase de invernadero.	67
Anexo I. Análisis de varianza para la evaluación de ocho tratamientos empleadas en el control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae). En condiciones de invernaderos.	68
Anexo J. Porcentaje de mortalidad obtenidos en la evaluación de ocho tratamientos para el control de <i>Astaena sp</i> (Coleoptera. Scarabaeoidae).	69

GLOSARIO

AISLAMIENTO: separación de un patógeno de su huésped y su cultivo en un medio de cultivo artificial.

CEPA: progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro.

ESPORA: unidad reproductiva de los hongos, constituida por una o varias células.

HOSPEDANTE: planta o animal que es invadida por un parásito y de la cual este obtiene sus nutrientes.

INOCULACIÓN: ponerse en contacto un patógeno sobre su huésped.

INÓCULO: conocido también como propágulo, es la mínima unidad infectiva de un microorganismo o patógeno, parte que ocasiona una enfermedad al entrar en contacto con el hospedero.

ENTOMOPATÓGENO: término que se aplica a los microorganismos que tienen la capacidad de producir enfermedad o muerte a los insectos.

MICELIO: hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

PATOGENICIDAD: capacidad relativa que tiene un patógeno para producir una enfermedad.

CHISA: (cuzo, mojoy o gallina ciega), término o nombre vulgar atribuido a las larvas de los Coleópteros de la familia Scarabaeidae.

CI₅₀: es la concentración a la cual se obtiene un 50% de mortalidad en una población homogénea.

RESUMEN

El presente ensayo se realizó en los meses de Junio del 2002 a Septiembre del 2003 en las instalaciones de Corpoica "C.I Obonuco", a una altitud de 2710 m.s.n.m una temperatura media de 13°C, con el objeto de evaluar cepas de hongos entomopatogenos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Astaena sp*, en condiciones de laboratorio e invernadero.

Se lograron aislar cinco cepas de hongos entomopatógenos de diferentes insectos en distintas localidades de la Zona Andina de Nariño, mediante una preselección se escogieron dos cepas, Bb.14 de *Beauveria bassiana* y Ma. 4 de *Metarhizium anisopliae*. Estas fueron evaluadas junto a las cepas Bb. Cosmo y Ma. 1, provenientes de la evaluación con larvas de *Ancognatha sp*. realizada en Corpoica "C.I Obonuco"

Para laboratorio se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial, para 4 tratamientos (cepas) y 6 subtratamientos (concentraciones) y el testigo.

En esta fase fueron seleccionados los tratamientos que se evaluaron en invernadero, los cuales se escogieron bajo un criterio de mortalidad superior a 80%. Además se determinó mediante el análisis Probit la concentración letal media el cual obtuvo un valor de 2.90401×10^5 para la cepa Bb14.

Previamente al ensayo de invernadero fue necesario evaluar el tipo de sustrato adecuado para el establecimiento de las larvas, encontrándose que el mejor fue la mezcla de suelo mas materia orgánica y sembrado con trigo, por presentar índices de mortalidad mas bajos.

El diseño utilizado para invernadero fue irrestrictamente al azar, el cual constaba de ocho tratamientos, un testigo y tres repeticiones.

Los tratamientos evaluados a nivel de invernadero fueron: Bb. 14 1×10^{10} , Bb. 14 1×10^9 , Bb. Cosmo 1×10^{10} , Bb. Cosmo 1×10^9 , Bb. 14 1×10^8 , Ma.4 1×10^{10} , Ma.4 1×10^9 , Ma.1 1×10^{10} , con mortalidades de 100%,92.1%, 97.3%, 84.6%, 82.47%97.24%, 96.49%86.49% respectivamente.

Para la prueba de patogenicidad en invernadero se evaluaron los anteriores tratamientos en materos de barro, con el sustrato seleccionado y con una población de 10 larvas por repetición, utilizando un matero para cada larva, adicional a esto las concentraciones se duplicaron para garantizar el establecimiento del hongo en el sustrato y se mantuviera la concentración calculada en laboratorio durante un período de 20 días.

Los resultados obtenidos en invernadero demuestran que los tratamientos Bb. 14 2×10^{10} y Bb. Cosmo 2×10^{10} presentaron los porcentajes de mortalidad mas altos con 40% y 35.23 % respectivamente, mientras que el porcentaje mas bajo lo obtuvo el tratamiento Ma.1 2×10^{10} con 6.15%.

ABSTRACT

The present investigation was carried out between June 2002 to September 2003 period, into the installations of Corpoica C.I Obonuco with a altitude of 2750 meters above sea level, a temperature mean of 13°C. with the object of evaluate fungus strains entomopathogens of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* about larvae of *Astaena spin* laboratory and greenhouse conditions.

Five fungus strains with entomopathogens features were isolated from different insects in diverse places of Andean area of Nariño, through a preselection, it was chosen two strains, Bb,14 of *Beauveria bassiana* and Ma.4 *Metarhizium anisopliae*. These were together with Bb. Cosmo and Ma. 1 strains, proceeded to larvae *Ancognatha sp* evaluation which was made in Corpoica C.I Obonuco.

It was a random design with factorial arrangement into laboratory, focused on 4 treatments (strains) and 6 sub-treatments (concentrations) and a witness.

Into the, it was selected treatments which were evaluated in greenhouse conditions, and which were chose under a criterion of mortality up 80%. Moreover, it was determined through a Probit analysis, the mean lethal concentration to each strains as a parameter to future researches.

Before doing the assay of greenhouse, it was necessary to test the type of adequate substrate in order to obtain the establishment of larvae under this conditions. It was found that the best assay was obtained through the soil and organic matter mixture and with wheat grown showed the lowest mortality rates.

The design used to greenhouse was unstrictly at random, which had eight treatments, a witness and three repetitions to each treatments.

The treatments which showed higher mortality percentages to 80% were Bb. 14 1×10^{10} , Bb. 14 1×10^9 , Bb. Cosmo 1×10^{10} , Bb. Cosmo 1×10^9 , Bb. 14 1×10^8 , Ma.4 1×10^{10} , Ma.4 1×10^9 , Ma.1 1×10^{10} , with mortalities of 100%, 92.1%, 97.3%, 84.6%, 82.47%97.24%, 96.49%86.49% respectively.

To patogenicity assay in greenhouse, it was tested the last treatments in plot slaughterhouse, with the substrate selected and with a larva a site, additional to it the concentrations were duplicated in order to guarantee the fungus establishment in the substrate and the calculated concentration inside laboratory will maintain.

The results obtained in greenhouse show that treatments Bb. 14 2×10^{10} y Bb. Cosmo 2×10^{10} showed the highest mortality percentages with 40% and 35.23% respectively, while the lowest percentage, it was obtained with the treatment Ma. 1 2×10^{10} with 6.15%.

INTRODUCCIÓN

Ruiz y Pumalpa, manifiestan que “En las regiones frías del departamento de Nariño, las chisas *Ancognatha sp* y *Astaena sp.* (Coleoptera: Scarabaeidae) son consideradas como limitantes de la producción de muchos cultivos, principalmente cereales y leguminosas, por los daños que ocasionan en las raíces hasta del 70%”¹. En los últimos años estos insectos se encuentran afectando entre un 30 a 40% de los cultivos de trigo, cebada, papa y otros establecidos en el departamento con pérdidas que van desde un 80 a 100%.

Esta situación indujo a los agricultores a establecer prácticas de manejo y control con el fin de disminuir las poblaciones larvales, utilizando como estrategia principal la aplicación indiscriminada de agroquímicos, incrementando los costos de producción y causando un desequilibrio en la entomofauna benéfica.

Actualmente las zonas que presentan mayor incidencia de esta plaga son los municipios de Yacuanquer, Ospina, Gualmatan zona baja, Sapuyes y Tuquerres, donde el excesivo laboreo y el inadecuado uso de los suelos han disminuido el contenido de materia orgánica lo que conlleva a desequilibrio del agrosistema y en los hábitos del insecto presentándose como plaga potencial para estas zonas.

El manejo integrado de plagas, se basa fundamentalmente en el manejo integrado que involucra controles biológicos, etológicos, culturales y químicos. Dentro de este, el control biológico mediante el uso de entomopatógenos, es una herramienta importante en programas encaminados a disminuir la población de la plaga, el uso de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, como microorganismos entomopatógenos de *Astaena sp.* representan una alternativa ecológica sostenible.

Ruiz y Pumalpa, argumentan que:

Dentro del control biológico, el uso de hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se constituye ayuda a disminuir el daño de las chisas en cultivos de papa, trigo y pastos; sin embargo, es conveniente buscar cepas virulentas y determinar las mejores concentraciones de esporas para obtener fundamentos técnicos necesarios para trabajos de biocontrol en el campo. Con ello, se tienen bases para la aplicación de estos agentes biocontroladores, con el fin de contribuir al manejo integrado de chisas, con lo cual se disminuye riesgos de contaminación

¹ RUIZ, Nhora. Y FUMALPA, Norberto. Conozca las chisas y su control. En : Boletín Informativo. Instituto Agropecuario. Colombia. 1987. p.3

ambiental, se reducen los costos del control, aplicándolos cuando las condiciones de clima y del suelo favorezcan la dispersión y sobre vivencia de los hongos biocontroladores².

Buscando alternativas de solución a estos problemas, se desarrolló este trabajo cuyo objetivo principal fue encontrar a nivel de laboratorio e invernadero cepas altamente virulentas de los hongos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Y *Metarhizium anisopliae* (metch.) Sorokin, aislados de insectos afectados en campo, para el control de chisas *Astaena sp*, además la evaluación de diferentes concentraciones de esporas de las cepas seleccionadas de mayor virulencia bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero y establecer un CL₅₀ en condiciones de laboratorio para futuras investigaciones

² *Ibid.*, p.1.

1. MARCO TEORICO

1.1 GENERALIDADES DE *Astaena sp.*

CORPOICA manifiesta que “en el departamento de Nariño, la chisa, mojoy o cuzo es una de las plagas que mayor daño económico ocasiona en los sistemas de producción, atacando cultivos de trigo, papa, maíz y pastos. Las larvas son rizófagas, es decir atacan la raíz de los diferentes cultivos”³.

1.2 CICLO BIOLÓGICO

Ruiz y Pumalpa, en este aspecto, afirman que:

1.2.1 Huevos. Los huevos de *Astaena sp* miden en promedio 1.5 mm de largo por 1,1 de ancho. Son depositados en grupos en forma de racimos con un promedio de 50 huevos por grupos, a una profundidad de 5.15 cm. Al remover el suelo las posturas de estas especies se observan a simple vista.

1.2.2 Larvas. Las larvas de esta especie tienen forma de “c”, tres pares de patas diferenciadas y funcionales, se encuentran a una profundidad de 5 – 20 cm, dependiendo de la disponibilidad de alimento. Completamente desarrollada la larva de *Astaena sp.* miden 2.5 cm de longitud y la cabeza es de color amarillo marrón. El estado larval es muy largo dura aproximadamente 18 meses, presentándose solamente una generación cada dos años.

1.2.3 Pupas. Las pupas son de tipo exarata y de color ámbar. Para empupar las larvas se profundizan de 30 a 50 cm y, elaboran una cámara redondeada que los agricultores llaman “olla”⁴.

³ CORPOICA . Manejo integrado de chisas en el departamento de Nariño. En : Boletín divulgativo N° 19, San Juan de Pasto, 2003. p. 5

⁴ Ruiz, Op cit., p. 3.

1.2.4 Clasificación taxonómica. Según Borrór y Delong, la clasificación taxonómica es:

Orden:	Coleoptera
Familia:	Scarabaeidae
Subfamilia:	Melolonthinae
Género:	Astaena
Especie:	<u>Astaena</u> sp.⁵.

CORPOICA manifiesta que:

El adulto se caracteriza por presentar una forma rectangular y alargada, su tamaño varía entre 1 y 1.2 cm, el cuerpo presenta una coloración café rojiza, la cabeza se torna más oscura que el cuerpo. El cucarrón vuela al empezar la noche, los adultos se presentan en mayor cantidad cuando comienzan las temporadas de lluvias, Marzo, Abril, Noviembre y Diciembre. Los cucarrones después de volar se entierran en el suelo donde ponen un promedio de 40 huevos⁶.

1.2.5 Distribución. Así mismo, CORPOICA afirma que “El género *Astaena* sp está ampliamente distribuido en Sur y Centroamérica; Para Colombia se registra principalmente la especie *tarsalis Moser*”⁷.

Ruiz y Pumalpa, argumentan que:

Su hábitat, son las regiones de clima frío. En el departamento de Nariño, se han encontrado cinco especies de chisas, y los municipios afectados son: Yacuanquer, Ospina, Sapuyes, Iles y Pasto, considerados como productores de cereales y otros cultivos afectados por chisas, pero donde mayor daño se ha observado es en Yacuanquer y Ospina, encontrándose poblaciones abundantes de *Ancognatha scarabaeoidae* y *Astaena* sp. En la primera localidad, mientras que en Ospina predominan *Astaena* sp.⁸.

1.2.6 Daños. El daño lo causan las larvas del último instar, dependiendo de la edad del cultivo, el ataque se manifiesta de tres formas

⁵ BORROR, Donal. An introduction to the study of insects. Nueva york : Mc Graw Hill, 1971. p. 10

⁶ CORPOICA, Op cit., p. 16.

⁷ Ibid., p. 16.

⁸ Ruiz, Op cit., p.3.

? Como trozadores de plántulas; en este caso las larvas cortan la plántula a la altura del cuello de la raíz, debajo de la superficie del suelo; causando el amarillamiento de la planta pero sin caerse⁹.

? Ruiz y Pumalpa, dicen que “Como comedores de raíces; caso en el cual reduce el sistema radicular hasta en un 70%, por lo cual las plantas pierden anclaje, el grano se vanea y hay volcamiento de la planta para el caso de cereales; además, perfora los tubérculos de papa”¹⁰.

? En pastos mejorados tales como: manawa, tetralite y los raígrases se producen un amarillamiento por que una vez aflojada la tierra por el insecto, el pisoteo del ganado causa desprendimiento del cespedón y las raíces no vuelven a sujetarse, lo que no sucede con el Kikuyo que posee un sistema radicular profundo que le permite recuperarse fácilmente después de un ataque¹¹.

? Estos daños son especialmente severos en cultivos localizados en lotes nuevos, que anteriormente fueron dedicadas a pastos o a cereales menores¹².

1.2.7 Hospedantes. Las chisas atacan a cultivos de clima frío, los principales hospedantes de las chisas son los pastos, pero también afectan a otros cultivos tales como cereales menores, maíz, frijol, fresa y papa¹³.

Los adultos se vuelven activos volando durante la noche y alimentándose del follaje de los cultivos antes mencionados, y hojas de otras plantas. A los primeros indicios de amanecer ellos regresan con rapidez al suelo¹⁴.

1.3 CONTROL Y MANEJO

1.3.1 Control biológico

? **Generalidades sobre control biológico en chisas.** Dentro de las estrategias posibles, el control biológico con hongos entomopatógenos ofrecen buenas alternativas para el manejo integrado de chisas, debido a que estos microorganismos en condiciones ambientales favorables reducen las poblaciones

⁹ Ibid., p.3.

¹⁰ Ibid., p.3.

¹¹ CASANOVA, W. Aspectos biológicos de las chisas *Ancognatha Scarabaeoidea*. Pasto, 1991, 80 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.p.3-4.

¹² Ibid., p.3-4.

¹³ Ibid., p. 4-5.

¹⁴ Ibid., p.5.

de la plaga hasta en un 50%. Se dice que la utilización de hongos entomopatógenos como control biológico es rentable, por la acción natural no tóxica para otras formas de vida, el relativo grado de especificidad de la mayoría de los patógenos, la compatibilidad de muchos patógenos con los insecticidas, la aparente lentitud de resistencia que desarrollan las plagas frente a un agente microbial, los bajos costos, las facilidades existentes para la producción masiva y las dosis relativamente bajas que se requieren para el control¹⁵.

Steinhaus, afirma que hay casos en que el hongo emite conidioforos al exterior, desarrollándose así cuerpos fructíferos que están en capacidad de infectar otros hospederos. En general las especies son más susceptibles en laboratorio y en gran medida su eficacia depende de las condiciones ambientales que se presenten en el momento y los días siguientes a la aplicación; sin embargo, existen especies más susceptibles que otras ¹⁶.

El mismo autor afirma que es de especial importancia conocer en resumen las ventajas y desventajas del control microbiano así:

Ventajas

? Poca o mínima patogenicidad para los animales benéficos y mínima destrucción del balance natural; no son peligrosos para los mamíferos incluido el hombre.

? Existen pocos reportes de especies de plagas resistentes a los patógenos.

? Pueden ser persistentes en la naturaleza después de su aplicación; sin embargo, hay muchos patógenos que no persisten en la naturaleza.

? Especificidad, no todos los patógenos son específicos frente a sus hospedantes.

Desventajas

? La velocidad con que producen efecto es muy lenta, son muy pocos los patógenos que producen un efecto de choque.

? Existen problemas para mantener la virulencia en el tiempo, la eficiencia de los patógenos se ve limitada en gran medida por las condiciones ambientales.

¹⁵ PAZOS, Ines y CHECA, Eduardo. Reconocimiento e identificación de hongos entomopatógenos en chisas *Ancognatha* sp. y *Astaena* sp (Coleoptero: Scarabaeidae) en la zona cerealera del departamento de Nariño. Pasto, 1990, 85 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. p.6.

¹⁶ STEINHAUS, eduard. Insect microbiology. Nueva York : Mc Graw -Hill, 1977. p.60.

? La calidad de los productos comerciales es variable.

Alves S, citado por Salazar J Y Salazar J, afirma que:

En general, la germinación de *Beauveria bassiana* ocurre en un periodo de 12 horas posterior a la inoculación, penetrando al insecto por una acción mecánica de efectos enzimáticos; después de 72 horas de la inoculación, el insecto está totalmente colonizado con una gran cantidad de conidioforos y conidias características de la especie. La duración de las diferentes fases del ciclo, de la relación patógeno – huésped, depende de la especie del insecto y de las condiciones ambientales predominantes¹⁷

En el cuadro 1 se muestra en forma aproximada y teniendo en cuenta la experiencia obtenida en la estación experimental obonuco, se detalla la estructura de costos de una botella de 750 g., de sustrato de *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae* y el precio al productor estimando un margen de utilidad del 20%.

Para el agricultor que los produce en forma artesanal y teniendo en cuenta que únicamente tiene que adquirir el envase, el PDA con muestra y el agua, los costos en efectivo solo son de \$ 154 por botella de 750 g., esta situación es un aspecto muy favorable para impulsar la producción y uso de entomopatógenos y justifica la intensificación de actividades de concientización y capacitación.

¹⁷ SALAZAR, Juan y SALAZAR, James. Efecto patogénico de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Sobre larvas de *Astaena sp* bajo condiciones controladas. Pasto, 1997, 92 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Cuadro 1. Costos de producción de entomopatógenos (botella de 750 g.).

CONCEPTO	VALOR (\$)
Costos variables	
Trigo (300g.)	150
Botella de vidrio	100
PDA (Papa – Agar – Dextrosa) con muestra	50
Energía	8
Agua	4
Mano de obra	600
Total costos variables	912
Costos Fijos:	
Depreciación de equipos	60
Arrendamiento, Administración y servicios públicos	438
Total costos fijos	498
TOTAL COSTOS	1410
Margen de utilidad (20%)	282
Precio de venta al agricultor	1692

FUENTE: CORPOICA. Boletín técnico N. 3.

? Clasificación taxonómica y estructural de hongos entomopatógenos

? *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Las especies del género *Beauveria* son principalmente parásitas de insectos, con amplio rango y distribución geográfica. La primera especie de *Beauveria* se conoció con el nombre de *B. globulifera*. (Speg) Picard, la cual se denomina actualmente *B. bassiana* En 1834 Agustino Basi identificó al hongo como el causante de la “muscardina blanca del gusano de seda”¹⁸.

Rodríguez, describe las colonias de *Beauveria bassiana* de color blanco púrpura y al envejecer se tornan de un amarillo pálido, uniforme y polvoso¹⁹.

Taxonómia

Las especies de *Beauveria* que atacan más frecuentemente a los insectos son *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y *Beauveria tenella*. En medio de

¹⁸ ALVEZ, S. Epizootología de controle microbiano de insectos. Sao Paulo : Manole.1986. p.105.

¹⁹ RODRÍGUEZ, Dora. Control microbiológico del gusano blanco de la papa *Premnotripex vorax* (Coleoptero: Curculionidae). EN XII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Resúmenes. Medellín, SOCOLEN. 1975. p.10.

cultivo forman un micelio blanco o ligeramente coloreado y de apariencia polvosa²⁰.

La clasificación taxonómica de *B. bassiana* es la siguiente:

Clase: **Deuteromycetes**
Orden: **Moniliales**
Familia: **Moniliaceae**
Género: **Beauveria**
Especie: **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill.²¹

El hongo Posee hifas septadas que forman conidioforos cortos, llevando fiálides simples o en grupos, cortos, con la base hinchada y que generalmente termina en zig – zag. Las conidias son uniceladas, hialinas y generalmente globosas.

? *Metarhizium anisopliae* (metch.) Sorokin

Las infecciones con *Metarhizium anisopliae* causan la “muscardina verde”, enfermedad descubierta por Metchnikoff en 1879 atacando larvas del escarabajo del trigo. Este investigador vislumbró la posibilidad de que el hombre lo usara en el control biológico²².

Taxonómia

La especie más importante es *Metarhizium anisopliae* la cual posee dos especies: *anisopliae* y *major*.

Clase: **Deuteromycetes**
Orden: **Moniliales**
Familia: **Moniliaceae**
Género: **Metarhizium**
Especie: **Metarhizium anisopliae**²³

El género *Metarhizium* forma sobre los insectos afectados un micelio polvoso de color verde, compuesto por conidioforos y conidias. Los conidioforos son cortos, septados, simples o con dos ramificaciones, llevando en los extremos fiálides

²⁰ SAÑUDO, Benjamín; CASTILLO, Guillermo. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. San Juan de Pasto, 1994. p. 15.

²¹ SAÑUDO, Benjamín et al. Fundamentos de micología Agrícola. Universidad de Nariño. Pasto - Colombia. 2001. p.73.

²² CASTAÑO, C. El diagnostico de las enfermedades de los insectos fitófilo. México : s.n, 1968. p.17-36.

²³ SAÑUDO, Op cit., p.70.

simples o en grupos, con cadenas de conidias de nacimiento bacipétalo. Estas son ovoides, unceladas, ligeramente pigmentadas o hialinas.

? **Entomopatógenos de chisas.** Según Fuertes y Chamorro²⁴, la mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* Burm, estuvo en relación directa con la concentración de esporas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Sorokin. El hongo *Metarhizium anisopliae* afecta huevos, larvas y adultos de *Ancognatha scarabaeoides*, obteniendo en todos los casos, altos porcentajes de mortalidad.

Además la eficiencia en el control fue mayor del 90% a partir de la cuarta evaluación (55 días) con las tres concentraciones, utilizando como sustrato el kikuyo, aserrín y tamo de trigo.

Pazos y Checa, reportan que en ensayos de campo empleando *Metarhizium sp.* *Beauveria sp.* para el control de *Ancognatha scarabaeoides*, y *Astaena sp.* Se observó de 10.2 a 33.03 % de control de plagas, usando arroz como sustrato²⁵.

Alomía y Cárdenas, determinaron que *Metarhizium sp.* presentó mayor patogenicidad sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, causando entre 18 y 30 % de mortalidad²⁶.

Pazos y Checa, identificaron los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Merch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Cordiceps sp.* afectando chisas en los municipios de Pasto, Sapuyes, Ospina y Yacuanquer del departamento de Nariño. El primero se encontró en todas las zonas sobre *Ancognatha scarabaeoides*, en tanto que los otros dos fueron específicos de *Astaena sp.* siendo registrada en pocas regiones la presencia de *Cordiceps sp.*²⁷.

Pazos y Checa, determinaron que el medio de cultivo a base de arroz húmedo y estéril, fue el mejor para el crecimiento de los hongos entomopatógenos y su esporulación *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. presentó el mejor crecimiento y *Metarhizium anisopliae* (Merch.) Sorokin, las más altas esporulaciones²⁸.

²⁴ FUERTES, Edgar y CHAMORRO, Jose. Control microbiano de las chisa *Ancognatha scarabaeoide* con el hongo entomopatógeno *Metharizium anisopliae*. Pasto, 1994, 80 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

²⁵ PAZOS, Op cit., p.93.

²⁶ ALOMIA, Eduardo. y CARDENAS, William. Evaluación de tres hongos entomopatógenos y dos insecticidas en el control de chisas (*Ancognatha_ Scarabaeidae B.* y *Astaena sp*) en Nariño. Pasto, 1990, 138 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. p.76-78.

²⁷ PAZOS, Op cit., p.93.

²⁸ Ibid., p.93.

Existe especificidad por los hospedantes, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. tiene capacidad patogénica sobre *Astaena sp.* mientras *Metarhizium anisopliae* (Merch.) afecta preferentemente *A. Scarabaeoides*²⁹.

Estudios encontrados en otros países han demostrado que existen bacterias como *Bacillus popilliae*, atacando larvas y adultos de insectos de la familia Scarabaeidae³⁰.

? **Modo de infección.** A diferencia de las bacterias y los virus que infectan al huésped por el tubo digestivo, después de la ingestión del alimento, los hongos penetran en el insecto a través del tegumento, esta es su característica fundamental. Las esporas al ponerse en contacto natural o artificial con el tegumento sensible a la micosis y en condiciones favorables para la germinación, desarrollan un tubo germinativo, que a través de las capas cuticulares, y por varios procesos físicos y enzimáticos, avanza hasta encontrar la cavidad general. Dentro de esta cavidad el huésped presenta fenómenos de defensa que fagocitan y enquistan los elementos miceliales, los que llegan a dominar la reacción, para la emisión de sustancias tóxicas que provocan la muerte del insecto³¹.

? **Diagnóstico de micosis.** Kuno y Mulett, indican que "*Beauveria bassiana* produce una toxina de alto peso molecular llamada (Beauverin), que es un antibiótico. Según estudios realizados se demostró que esta toxina no tiene nada que ver con la patogenicidad del hongo"³².

Los mismos autores manifiestan que:

Metarhizium anisopliae es patógeno de más de 200 especies de insectos en 7 ordenes, es un parásito autónomo que crece también como saprófito. El ciclo de vida es de tipo imperfecto con reproducción asexual (conidias), puede entrar por la cutícula o por ingestión, el insecto muere por toxinas y por invasión de órganos de micelio, en otros casos libera sustancias letales en el insecto, llamadas destruxinas y compuestos como citocalasina D y E, en estos casos aparentemente no germinan³³.

²⁹ Ibid., p.93.

³⁰ BOLAÑOS, F. *Bacillus popilliae* como organismo entomopatogeno. IICA. Ecuador. Citado de: Biological control a guide to natural enemies in North American (Universi de Cornell) www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/bpopilliae.html. google.com

³¹ PAZOS, Op cit., p.5.

³² KUNO, Goro; MULETT, José y HERNÁNDEZ, Martha. Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. Cali, 1982, 212 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad del valle, Dpto de biología.

³³ Ibid., p.126.

Según DeBach, citado por Alomía y Cárdenas. “Los síntomas iniciales de ataque son similares a los ocasionados por grupos microbiales diferentes, pues los insectos enfermos son poco activos y dejan de alimentarse, pero usualmente conservan la forma y el color. Al final es característico el secamiento y momificación del cuerpo, el cual puede tornarse quebradizo”³⁴.

El diagnóstico más importante de una micosis es la aparición de unas estructuras reproductivas o una masa micelial algodonosa y polvosa sobre todo el cuerpo o en las áreas donde la pared de éste es más delgada, como en las membranas entre segmentos. En condiciones secas es necesario colocar los insectos momificados en un lugar húmedo para obtener el crecimiento fungoso³⁵.

Sañudo. et al³⁶, Describen que la mayoría de las micosis, se caracterizan por el crecimiento de las estructuras hifales de colores verdes o blanco acompañadas de esporulación y cubrimiento sobre los individuos muertos, las cuales permiten una aproximación a la identificación del género del hongo parásito.

? **Condiciones ambientales.** Estudios realizados a fines del siglo pasado, demuestran la importancia de la temperatura y la humedad relativa en el crecimiento de los hongos entomopatógenos, encontrándose los óptimos entre 23 y 28°C y 60% respectivamente.³⁷

Pazos y Checa, Afirman que en arroz el crecimiento y esporulación de *Metarhizium anisopliae* (Merch.) Sorokin, y *Cordiceps sp.* fue mejor a 25°C, en cambio *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. tuvo mejor comportamiento a la temperatura ambiente de laboratorio a 20°C. En esta temperatura la mayor esporulación la tuvo *Metarhizium anisopliae* (Merch.) Sorokin, y la más baja *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill³⁸.

Alves; citado por Salazar y Salazar, afirman que “el insecto es capaz de secretar ceras, que provocan resistencia a la penetración del hongo, lo cual esta directamente relacionado con las condiciones climáticas existentes”³⁹.

³⁴ ALOMIA, Op cit., p.12.

³⁵ CASTAÑO, Op cit., p.17-36.

³⁶ SAÑUDO, Benjamín et al. Fundamentos de micología Agrícola. Universidad de Nariño. Pasto - Colombia. 2001. p.32.

³⁷ PAZOS, Op cit., p.71.

³⁸ Ibid., p.93.

³⁹ SALAZAR, Op cit., p.15.

Condiciones de tipo abiótico como la humedad temperatura, radiación, pH, cantidad de nutrientes y aplicaciones de pesticidas son factores que predisponen el desarrollo y prevalencia de los hongos en el suelo⁴⁰.

Por esta razón, los programas de control biológico deben tener en cuenta estas condiciones nutricionales y microambientales, ya que son factores determinantes en la acción efectiva y fijación de hongos entomopatógenos en el suelo⁴¹.

? **Efecto del origen de las cepas sobre el control de insectos.** Roberts y Humbre, citados por Mena J, recomiendan:

Utilizar aislamientos nativos extraídos del insecto ya que existen modificaciones específicas en la superficie de conidias hacia el hospedero; Aunque estas sugerencias no incluyen el hecho de que puedan existir hongos más virulentos que los nativos en otras zonas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de encontrar hongos exóticos que actúen efectivamente en determinados insectos. Para ello, es condición básica que exista compatibilidad entre el medio ambiente del área original del parásito y el clima del área de introducción ya que los hongos son susceptibles a los factores climáticos⁴².

Teniendo en cuenta lo anterior se puede afirmar que los aislamientos pueden no resultar específicos y que la selección de estos es importante antes de iniciar un programa de control biológico con un entomopatógeno no estudiado.

A partir de recolecciones de materiales de campo, CORPOICA Obonuco, aisló 6 cepas de *Beauveria bassiana* y una de *Metarhizium anisopliae*, que ejercen control natural en *Premnotrypes vorax* (Hustache), en diferentes zonas donde se cultiva la papa en el departamento de Nariño, pero las dosis letales no han sido investigadas como para pensar en recomendaciones a nivel comercial Arteaga y Peña⁴³.

? **Concentración letal media CL₅₀.** Para este tipo de patógenos la concentración letal, es la cantidad de conidias necesarias para causar la muerte a un 50% de una población homogénea y no se puede hablar de una dosis general.

⁴⁰ MENA, Jacqueline. Patogenicidad y variación de efectividad de *Beauveria bassiana* (bals) Vull y *Metarhizium anisopliae* (Metch) en diferentes condiciones ambientales, en poblaciones naturales de *Premnotripex vorax* (Hustache). Cali, 1999, 200 p. Trabajo de grado (maestría en biología). Universidad del valle. Facultad de ciencias. p.66.

⁴¹ SAÑUDO. Fundamentos de micología agrícola. Op cit., p.32.

⁴² MENA, Op cit., p.28.

⁴³ ARTEAGA, R y PEÑA, L. "Evaluación del control de gusano blanco mediante la utilización del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*." En: Informe preliminar N° 1 PRONATTA (datos sin publicar), Pasto. 1996. p37.

Por lo tanto, hay que evaluar el efecto de varias concentraciones en cada especie para detectar parámetros como la concentración letal media CL_{50} ⁴⁴.

1.3.2 Control físico. Otra forma de control de la chiza es el uso de trampas de luz para captura de adultos, las cuales se colocan en los lotes infestados o en las viviendas y en las épocas de mayor precipitación; por lo general, en los meses de octubre y noviembre cae la mayor cantidad de adultos aproximadamente 15000 insectos semestrales, estas trampas se colocan sobre una fosa, donde previamente se ha colocado tamo de trigo o residuos de cosecha y con la ayuda de una malla se cubre la fosa para evitar que los adultos de chiza escapen⁴⁵.

Figura 1. Trampa de luz y fosa donde caen los adultos



Fuente: CORPOICA. Boletín divulgativo N° 19

En el cuadro 2 se relacionan los materiales y mano de obra y su costo para la construcción, el cual asciende a \$38.700. Si se estima una vida útil de 5 años, el costo anual es \$ 7.740, más el consumo de energía por tres horas diarias durante los meses de octubre, noviembre y diciembre por \$ 4.600, el costo anual es de \$12.340, considerado bajo, si se relaciona con el beneficio económico que se obtiene a través de ella.

Cuadro 2. Costos para la construcción y uso de una trampa de luz

⁴⁴ KUNO, Op cit., p.63-70.

⁴⁵ CORPOICA, Op cit., p.3.

Concepto	Unidad	Cantidad	Vr. Unitario	Vr. Total
Plástico color negro de 3 m. De ancho	Metro	0,5	2500	1250
Varengas de 4x4 cm. X 2.5 m. De largo	Varenga	2	1500	3000
Bombillas de 60 w, color azul	Bombilla	2	800	1600
Boquillas de 4 puntos en porcelana	Boquilla	2	500	1000
Vidrio de 3 mm, recortados a 54x18 cm.	Vidrios	4	1500	6000
Clavija en caucho	Clavija	1	700	700
Toma corriente en porcelana	Toma	1	500	500
Cable dúplex No. 14	Metros	10	400	4000
Alambre galvanizado No. 10	Metros	3	150	450
Alambre galvanizado No. 14	Metros	2	100	200
Balde plástico, capacidad 12 galones	Balde	1	500	5000
Mano de obra				15.000
Total				38.700

FUENTE: CORPOICA. Boletín técnico N. 3.

1.3.3 Control químico. Antes de aplicar cualquier medida de control, es necesario hacer un muestreo con el fin de conocer el estado predominante de la plaga, su abundancia y la distribución en el lote, debido a que los ataques de esta plaga son en parches

Por lo tanto, los muestreos deben hacerse en zig-zag, utilizando un cuadrado de 30 x 30 cm y cavando hasta 20 cm de profundidad. De cada submuestra se debe anotar el número de lo encontrado ya sean huevos, larvas, pupas o adultos. Cuando se encuentre la mayoría de la población en larvas que miden de 2 a 3 cm de largo y en número mayor a 20 por metro cuadrado, se justifica aplicar control químico, cuando se encuentren menos de 20 larvas / metro cuadrado, el control se debe efectuar en los parches donde se ha localizado la plaga⁴⁶.

Ruiz y Pumalpa. Recomiendan la incorporación a 20 cm de profundidad, 30 días antes de la siembra, de cualquiera de los siguientes productos: clorpirifos 2.5 p, ethoprop 20G e isazofos 5G en dosis de 30 – 40 kilos de p.c./ha⁴⁷.

⁴⁶ RUIZ, Op cit., p.2.

⁴⁷ Ibid., p.2-3.

2. DISEÑO METODOLOGICO

2.1 LOCALIZACIÓN

Los trabajos de laboratorio e invernadero se realizaron en las instalaciones de la Corporación Colombiana de Investigación C.I - Obonuco. Ubicada a 5 Km del sur occidente de la ciudad de San Juan de pasto, a una altura de 2710 m.s.n.m, temperatura promedio de 13°C y una humedad relativa promedio de 87.45%, durante enero de 2002 y diciembre de 2003.

? **Colección de larvas infectadas.** La recolección de chisas afectadas por los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* se realizaron en el Municipio de Yacuanquer en la vereda de Mejía a una altitud de 2.690 m.s.n.m, con una temperatura media de 13°C y una precipitación anual de 900 mm y en Pasto en la vereda Obonuco. A una altura de 2710 m.s.n.m, con una temperatura de 13°C, y una precipitación pluvial 840 mm/ año.

? **Colección de larvas para la evaluación.** Las larvas de *Astaena sp.* utilizadas para los ensayos de laboratorio e invernadero se recolectaron en las mismas localidades. Donde se han detectado cultivos principalmente de trigo y papa atacados por la plaga, se realizaron visitas en las épocas de mayor presencia de chisas. Se seleccionaron las larvas que estaban en 4 y 5 instar y se las llevó a una fosa con tierra y materia orgánica durante un período que garantizará obtener larvas sanas, para posteriormente ser utilizadas en la evaluación.

La identificación de la especie se hizo mediante el uso del estereoscopio, observando la distribución de las setas en el raster de la larva y características propias de la especie como el tamaño de 2 a 2.5 cm y color de la cabeza, según lo planteado por Ruiz y Pumalpa⁴⁸.

2.2 FASE DE LABORATORIO

2.2.1 Aislamiento y purificación de cepas. Los insectos que presentaban micelio en su cuerpo fueron llevados a laboratorio para realizar su respectivo aislamiento, para ello se puso en práctica la metodología propuesta por Sañudo y Castillo. La cual consistió en sembrar directamente, con una aguja estéril esporas de los hongos a partir de insectos muertos afectados traídos de campo, sembrando en el medio de cultivo (PDA), el cual contiene 100 g de papa, 17 g de agar, 20 g de dextrosa, 9 gotas de ácido láctico y 1 ml de ácido sulfúrico y usar un asa de transferencia impregnada de micelio o esporas, para hacer rayados en zig – zag sobre la superficie del medio contenido en las cajas de petri.

⁴⁸ Ibid., p.2.

Después de la labor de aislamiento, las cajas petri se dejaron a temperaturas ambiente de laboratorio, o en estufas de incubación a 20-30°C, hasta la aparición de las colonias. Luego, se procedió a purificar e identificar los hongos. Haciendo uso del microscopio, se tomó una pequeña muestra y se montó en un portaobjeto fragmentos de micelio para realizar la identificación con ayuda de claves taxonómicas propuestas por Sañudo y Castillo⁴⁹; determinándose el aislamiento de 5 cepas de *Metarhizium anisopliae* y 4 de *Beauveria bassiana*. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Procedencia de las cepas de entomopatógenos utilizadas para la preselección en laboratorio.

ENTOMOPATÓGENO	CEPA	HOSPEDANTE ORIGINAL	LUGAR DE PROCEDENCIA	
			MUNICIPIO	VEREDA
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 4	Ancognatha sp	Yacuanquer	Mejia
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 13	Ancognatha sp	Yacuanquer	Mejia
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 14	Astaena sp	Pasto	Obonuco
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 15	Premnotrypes sp	Pasto	Obonuco
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 17	Ancognatha sp	Yacuanquer	Mejia

2.2.2 Preselección de las cepas. De las anteriores cepas mencionadas se realizó un lavado micelial del hongo y se llevó a un volumen 50 ml con agua destilada, posteriormente con ayuda del microscopio y la cámara de Neubauer se realizó el conteo de las esporas para determinar la cantidad por mililitro, se realizaron diluciones en tubos de ensayos a partir de la solución madre hasta obtener la concentración deseada (1×10^7 y 1×10^8). Según la metodología planteada por CENICAFE⁵⁰ para determinar la concentración de esporas.

Se realizó la inoculación de las chisas sumergiéndolas durante 30 segundos en sus respectivas concentraciones posteriormente se introdujeron en recipientes plásticos de color blanco con la tapa perforada y en el fondo papel toalla húmeda con (PDA) para favorecer el desarrollo del hongo y la supervivencia del insecto.

Se realizaron lecturas cada 48 horas para identificar las larvas muertas con presencia de signo del patógeno durante 20 días.

Este fue montado con el objeto de seleccionar solo dos de las mejores cepas aisladas de campo para la segunda fase de la investigación, con el fin de mejorar

⁴⁹ SAÑUDO. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Op cit., p.25.

⁵⁰ CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DEL CAFÉ. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Bogotá : CENICAFE. 1995. p10.

la metodología del ensayo. Posteriormente, se enfrentaron a las dos mejores cepas evaluadas sobre *Ancognatha sp* en la primera fase.

? **Fases de evaluación.** La primera fase fue desarrollada por Corpoica en el C.I Obonuco, donde se realizaron evaluaciones de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que CORPOICA previamente evaluó con larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, y seleccionó las cepas Bb. Cosmo y Ma. 1, como las de mejor comportamiento, los cuales se enfrentaron a las cepas procedentes de esta investigación con larvas de *Astaena sp* la cual denominamos fase 2. (cuadro 4)

Cuadro 4. Cepas seleccionadas para las pruebas de patogenicidad en larvas de chisas *Astaena sp* en la fase de invernadero.

Cepas seleccionadas	Época de evaluación
Bb 14	Fase 2
Ma 4	Fase 2
Bb cosmo	Fase 1
Ma 1	Fase 1

2.2.3 Pruebas de patogenicidad. Para la prueba de patogenicidad en laboratorio se escogieron las cajas petri de mayor esporulación de las cepas seleccionadas *Beauveria bassiana* (Bb.14) y *Metarhizium anisopliae* (Ma 4) más las cepas *Beauveria bassiana* (B.b cosmos) y *Metarhizium anisopliae* (Ma 1). (cuadro 2)

Para la determinación de las concentraciones de esporas para realizar las inoculaciones, se hizo una dispersión de ellas en un volumen conocido de agua destilada (100 ml) más una gota de Twin 80, se filtró por medio de un tamiz para colar partículas de sustrato y así obtener una adecuada suspensión de esporas.

Figura 2. Cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* utilizadas en el ensayo para el control de larvas de *Astaena sp*



Obtenido el lavado micelial se procedió a hacer diluciones seriadas en tubos de ensayo, adicionando 1 ml de la solución madre en 9 ml de agua destilada

esterilizada (A.D.E) (dilución 10^{-1}), este procedimiento se repitió hasta llegar a la dilución 10^4 , donde fue posible hacer un conteo de manera precisa mediante la utilización de la cámara de NEUBAWER y un microscopio de luz, en el objetivo (40x) con un ml de la dilución.

Se hizo el recuento de las esporas en el cuadro central de 25 cuadrantes, se tomaron 5 lecturas al azar para finalmente sacar un promedio; el cual se multiplicó por el factor de corrección de la cámara de conteo (4×10^5) y por el recíproco de la dilución que se utilizó para el conteo (10^4) determinando la concentración de la solución madre, mediante la fórmula

$$X = 4 \times 10^5 * 10^4 * Y$$

X = Concentración de solución madre

4×10^5 = Factor de la cámara

10^4 = Recíproco de las diluciones

Y = Número promedio de conidias encontradas

Una vez identificada la concentración de la solución madre se realizaron diluciones de esta en A.D.E , hasta obtener concentraciones de (1×10^5 hasta 1×10^{10} esporas / ml).

Para realizar las inoculaciones seguimos las siguientes consideraciones:

- Se utilizó una población homogénea de chisas recolectadas en campo.
- Se trató de que las chisas estuvieran en el cuarto o quinto instar.
- Se empleó un número mínimo de 10 individuos por tratamiento
- Se determinó mortalidad por medio de la siguiente fórmula:

Mortalidad larval (%M). Con base en la población original (10 larvas) y la población afectada por el hongo

$$\% M = \frac{Po - Lv}{Po} \times 100$$

Po: Población inicial

Lv: larvas muertas por el tratamiento

Eficacia de cada tratamiento (%E). Se utilizaron los resultados obtenidos en la variable anterior (%M) y ajustados mediante la aplicación de la fórmula de Abbott.

$$\%E = \frac{P - C}{100 - C} \times 100$$

P : % de mortalidad en el tratamiento

C : % mortalidad del testigo

Las chisas se lavaron con agua y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5 %, posteriormente se lavaron nuevamente con A.D.E y se realizaron las inoculaciones sumergiendo los insectos por 30 segundos en la suspensión de esporas.

Estas se colocaron en la unidad experimental, que correspondió a 1 tarro plástico de 5cm de alto por 4cm de diámetro y en el fondo de éste se colocó un círculo de papel toalla el cual fue impregnado con un milímetro de agua destilada para mantener una humedad alta. Luego se procedió a colocar una chisa por cada tarro y como alimento para las chisas se agregó 2 ml de PDA y 2 ml de agua destilada.

Figura 3. Unidad experimental para la prueba de patogenicidad en laboratorio para el control de larvas de *Astaena sp* con cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*



Se realizaron observaciones cada 48 horas los primeros 25 días después de la inoculación, para evaluar la mortalidad y presencia de síntomas del patógeno.

Las chisas muertas se llevaron a cámaras húmedas en cajas de petri para recuperación de signos del patógeno y verificar si fueron muertas por el hongo o por otras condiciones adversas.

2.2.4 Diseño experimental en laboratorio. Se trabajó con un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A correspondió a 4 tratamientos (2 cepas de *Beauveria bassiana* y 2 cepas de *Metarhizium*

anisopliae) y el factor B correspondió a los 6 subtratamientos que consistieron en diluciones de 1×10^5 esporas / ml hasta 1×10^{10} esporas / ml y un testigo absoluto. La interpretación estadística de los datos recolectados, se realizó mediante el análisis de varianza y para la comparación de medias se realizó la prueba de Duncan al 0.5%. Los datos fueron transformados mediante la fórmula Arco seno $\sqrt{\%}$. Además para cada cepa se determinó la **CL₅₀** mediante el análisis Probit para futuras investigaciones.

Multiplicación masiva de hongos entomopatógenos. Para la fase de invernadero fue necesario una multiplicación masiva de estos hongos debido a que la cantidad de inóculo proporcionado era mayor.

Se trabajó con los sustratos orgánicos arroz para *Metarhizium anisopliae* y granos de trigo para *Beauveria bassiana*, los medios de arroz y trigo fueron sometidos a cocción, posteriormente se llenaron botellas de vidrio rotuladas con capacidad de 750 g. cada una, se utilizaron tapones de algodón limpios, para hacer la esterilización en autoclave a 120°C de temperatura y 20 lb. de presión durante 15 minutos.

En cada frasco con el respectivo sustrato se sembró cada cepa del hongo en forma individual, colocando una pequeña porción del hongo esporulado sustraído de las cajas petri, sobre la superficie del medio. La siembra se realizó con asepsia en presencia de un mechero y empleando un aza metálica esterilizada, el desarrollo del hongo se hizo bajo condiciones de temperatura ambiente del laboratorio de sanidad vegetal de CORPOICA.

Figura 4. Cría masiva en botellas de las cepas Ma. 1, Ma. 4, Bb. Cosmo, Bb. 14 para el control de larvas de *Astaena sp*, con cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*



2.3 FASE DE INVERNADERO

Mediante pruebas de comparación de medias de Duncan se escogieron los tratamientos de mayor eficacia con un criterio de mortalidad (>80%)

2.3.1 Ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* en invernadero. Se realizó un ensayo preliminar para determinar condiciones favorables de hábitat bajo invernadero de las larvas de *Astaena sp*, con cuatro tratamientos y 3 repeticiones, las unidades experimentales fueron de 5 materos de barro en los cuales se depositó una larva, para un total de 60 unidades experimentales llenándolos con los sustratos que se describen a continuación.

- ☞ suelo
- ☞ suelo más materia orgánica
- ☞ suelo más trigo
- ☞ suelo más trigo adicionando materia orgánica

2.3.2 Prueba de patogenicidad en invernadero. Las concentraciones de los tratamientos escogidos en la fase de laboratorio se duplicaron para aumentar la capacidad de inóculo; según trabajos realizados por Mena. J⁵¹. quién recomienda doblar las concentraciones que se evaluarían en esta fase, debido a que en condiciones menos controladas pueden existir factores que disminuyan la viabilidad de las esporas como humedad, microorganismos, pH y temperatura. El hecho de incrementar la dosis garantiza que la concentración que se fija al suelo se aproxime a la calculada en laboratorio.

Como unidad experimental se utilizaron 400 materos de barro con capacidad de 30 onzas, cada matero fue llenado con dos partes de suelo y una parte de materia orgánica (tamo de trigo descompuesto), en los cuales se sembró trigo con el fin de dar las condiciones favorables para la supervivencia de las larvas, de acuerdo al ensayo preliminar de sustrato establecido para la fase de invernadero. En cada matero se colocó una larva de tercer a cuarto instar de *Astaena sp*. a una profundidad de 5cm.

2.3.3 Diseño experimental en invernadero. Se estableció un diseño irrestrictamente al azar con 8 tratamientos (Bb. 14 2×10^{10} , Bb. Cosmo 2×10^{10} , Bb. 14 2×10^9 , Bb. Cosmo 2×10^9 , Bb. 14 2×10^8 , Ma. 4 2×10^{10} , Ma. 4 2×10^9 , Ma. 1 2×10^{10}) y tres repeticiones por tratamiento; cada repetición constó de 10 materos.

⁵¹ MENA, Op cit., p.37.

Inoculación. Para la determinación de las concentraciones se siguió la misma metodología planteada en la fase de laboratorio.

Establecida la concentración de la solución madre se realizaron las respectivas diluciones para obtener las concentraciones evaluadas, teniendo en cuenta que estas fueron duplicadas para aumentar su capacidad patogénica.

Una vez desinfectadas las larvas estas se colocaron en los materos a una profundidad de 5 cm cubriéndolas con suelo para luego aplicar 50 cc de la suspensión de esporas por drench para cada tratamiento.

Una vez establecido el ensayo se mantuvo una humedad constante aplicando riego diario en horas de la mañana.

La evaluación se llevó a cabo a los 20 días después de realizado el montaje. Se hizo el conteo de larvas vivas y afectadas determinando el porcentaje de mortalidad corregida mediante la fórmula de Abbott.

Para los datos recolectados, se realizó un análisis de varianza y para la comparación de medias se realizó la prueba de Duncan al 0.05%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

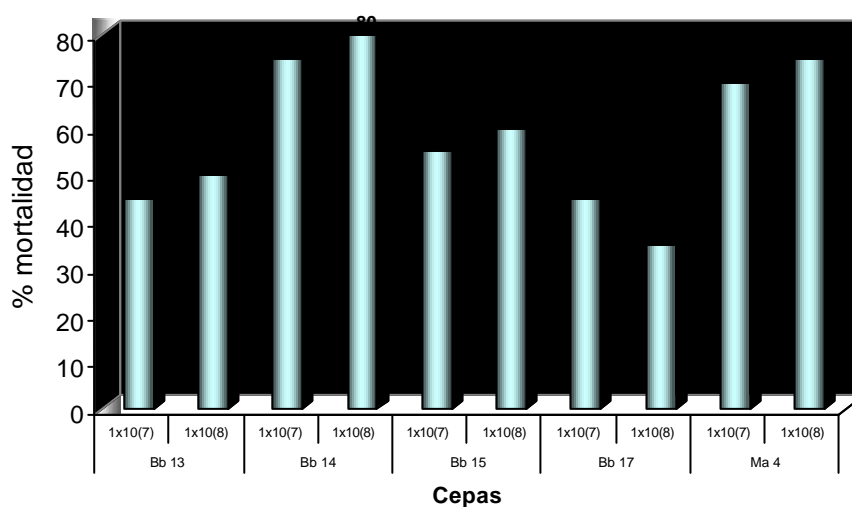
Descripción de síntomas. Una vez montados los ensayos, se realizó un seguimiento descriptivo de las larvas, los primeros síntomas comenzaron a observarse alrededor del cuarto al quinto día de la inoculación, presentándose poca movilidad de estas y una pérdida del apetito, posteriormente después de 12 a 36 horas estas mueren, las larvas muertas se recolectaron y se llevaron a cámara húmeda para favorecer la esporulación o recuperación de signos y determinar si su muerte fue causada por el hongo o por otros factores. La aparición de los primeros signos ocurre a partir de las 48 horas en promedio después de la muerte del insecto.

3.1 FASE DE LABORATORIO

3.1.1 Preselección de las cepas aisladas. En la (Figura 5) se ilustra el comportamiento de las cepas para el ensayo preliminar.

De acuerdo con este ensayo se seleccionaron las cepas que presentaron mayor mortalidad. Las cepas seleccionadas corresponden a Bb. 14 y Ma. 4, las cuales presentaron los más altos porcentajes de mortalidad con un 75 y 80 % para Bb. 14 y un 70 y 75 % para Ma 4. en concentraciones 1×10^7 esporas /ml y 1×10^8 esporas /ml respectivamente. (anexo A)

Figura 5. Ensayo preliminar para la selección de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena* sp (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.



3.1.2 Pruebas de patogenicidad para laboratorio. El análisis de varianza (anexo B) presenta diferencias altamente significativas para las cepas, concentraciones y la interacción cepa por concentración.

Teniendo en cuenta lo anterior y la prueba de rangos múltiples de Duncan, se encontró que la cepa Bb. 14 presentó el mayor porcentaje de mortalidad con 56.56 %, sin diferencias significativas con la cepa Bb. cosmo la cual dio una mortalidad de 53.80 % pero si hay diferencias significativas con las cepas Ma 4 y Ma 1, las cuales presentaron una mortalidad de 51.55 y 41.00 % respectivamente (Figura 6).

Esto pudo deberse a la especificidad de *Beauveria bassiana* sobre *Astaena sp* y a que es un aislamiento de la cepa nativa, adquiriendo mayor patogenicidad, fenómenos que pueden ser atribuidos a componentes de origen genético que permiten la variación en la eficacia entre las diferentes cepas de los entomopatógenos. Lo cual concuerda con lo demostrado por Salazar y Salazar⁵², donde encontraron que los mejores resultados en el control de larvas de chisas *Astaena sp* con cepas de *Beauveria bassiana* están relacionados con la especificidad de estas hacia esta especie y adaptación de los aislamientos.

los mejores comportamientos entre cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fueron Bb. 14 con respecto a Bb. cosmo y Ma 4 con respecto a Ma 1, esto se debió a que las dos primeras cepas (Bb. 14 y Ma 4) por ser aisladas directamente de insectos afectados para esta evaluación, presentaban una mayor actividad y capacidad patogénica, mientras las dos últimas (Bb. cosmo y Ma 1) se encontraban aisladas y almacenadas en cajas de petri en laboratorio lo cual pudo disminuir su capacidad patogénica al no realizar una reactivación del hongo. Hecho que de acuerdo al estudio adelantado por Gonzáles, citado por Mena J⁵³. incrementa la patogenicidad del entomopatógeno en un 11.12%.

Otro factor que incidió en el comportamiento de las cepas de una misma especie puede deberse a lo reportado por, Fargues y Doberski citado por Alomía y Cárdenas⁵⁴, señalando que el efecto de las diferentes cepas del hongo entomopatógeno sobre su huésped depende directamente del grado de virulencia de cada uno, cuando trabajaron con diferentes biotipos del mismo hongo actuando contra diferentes insectos. Esto explicaría las diferencias presentadas entre las dos cepas de *Beauveria bassiana*, las que se obtuvieron de dos especies diferentes. (figura 6)

En cuanto a las concentraciones en la figura 7 se puede observar que para esta variable todas presentaron diferencias entre si, donde 1×10^{10} esporas /ml,

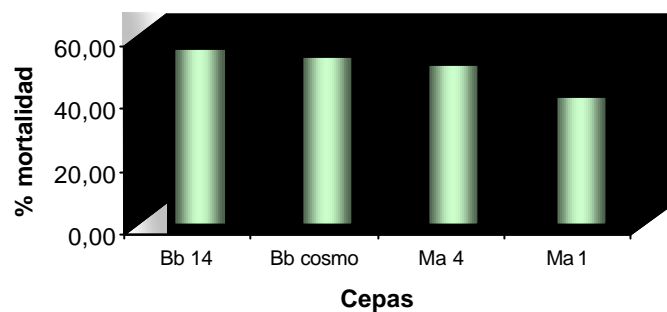
⁵² SALAZAR, Op cit., p.49.

⁵³ MENA, Op cit., p.30.

⁵⁴ ALOMÍA, Op cit., p.45.

demonstró ser la más efectiva con un porcentaje de mortalidad del 95.26%, siendo la más baja 1×10^5 esporas /ml con 22.13% de mortalidad.

Figura 6. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de 2 cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabae oidae) en condiciones de laboratorio



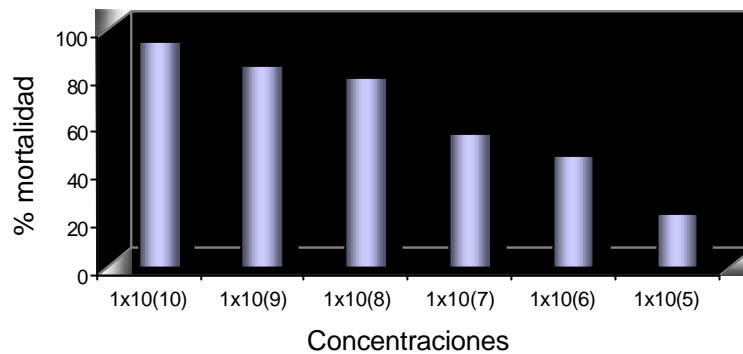
Este efecto se debe a que existe una relación directa entre la cantidad del inóculo y la efectividad del patógeno, garantizando una mayor oportunidad para que las esporas causen infección, observándose una respuesta directamente proporcional entre el incremento de la dosis y la mortalidad de los individuos estudiados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pazos y Checa⁵⁵, quienes reportan que en la prueba de patogenicidad de hongos entomopatógenos encontraron que la mayor concentración de esporas del hongo *Metarhizium anisopliae* 1×10^8 esporas / ml presentó mayor mortalidad larval de chisas.

La relación de la dosis y la mortalidad también dependen de la calidad patogénica de la cepa, ya que al aumentar la concentración adquieren mayor esporas viables ejerciendo una presión de tipo patogénico a la infección de las larvas.

En la interacción cepa por concentración se observa que la cepa Ma. 1 presentó diferencias significativas para las concentraciones empleadas, el mayor porcentaje de mortalidad fue de 86.48%, el cual se obtuvo con la concentración de 1×10^{10}

⁵⁵ PAZOS, Op cit., p.91.

Figura 7. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de 6 concentraciones dos cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.



eporas/ml, Los menores porcentaje de mortalidad se dieron con 1×10^6 esporas /ml y 1×10^5 esporas /ml con 38.65 y 24.91 respectivamente sin presentar diferencias significativas entre estos, (Figura 8).

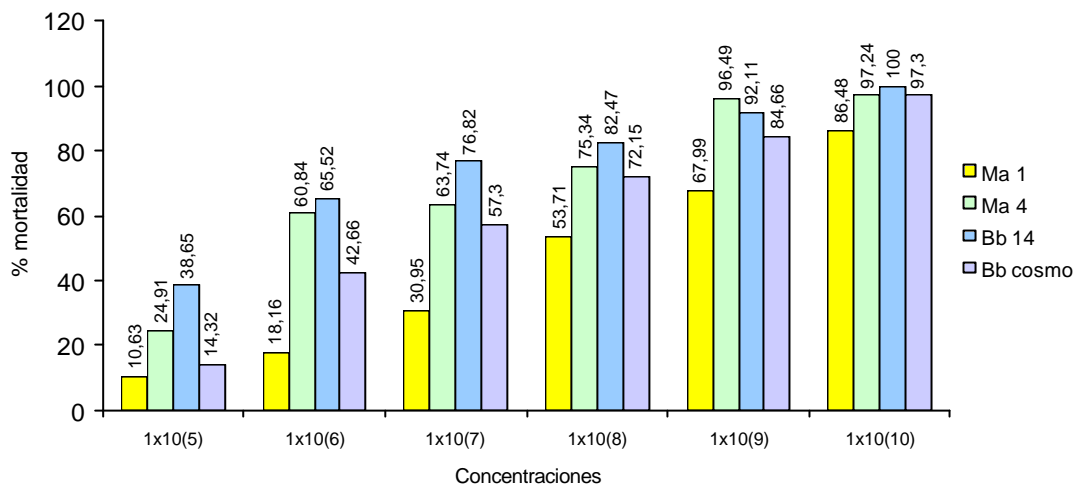
Aunque hubo diferencias entre concentraciones, los porcentajes de larvas afectadas no superaron el rango aceptable para nuestro ensayo de mortalidad (> 80%), a excepción de la concentración 1×10^{10} esporas /ml la cual clasificó para la fase de invernadero.

En la cepa Ma 4 se dió una mortalidad del 97.24% con la concentración de 1×10^{10} esporas/ml, sin presentar diferencias significativas con la concentración 1×10^9 esporas/ml, la cual dió una mortalidad de 96.49%. Pero si hay diferencias significativas con las demás concentraciones empleadas, siendo la más baja 1×10^5 esporas /ml con un porcentaje de mortalidad de 24.91% (Figura 8).

En la misma figura se observa que para la cepa Bb. 14, la concentración de 1×10^{10} esporas/ml, dió una mortalidad del 100%, presentando diferencias significativas con las demás concentraciones, siendo la más baja 1×10^5 esporas /ml con un porcentaje de mortalidad de 38.65%.

En la misma figura también se aprecia que para la cepa Bb. Cosmo, el mayor porcentaje de mortalidad fue de 97.30% y se dió con la concentración de 1×10^{10} esporas/ml, con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, presentando menor efectividad la concentración 1×10^5 esporas /ml con un porcentaje de mortalidad de 14.32%.

Figura 8. Porcentajes de mortalidad de la interacción de seis concentraciones de dos cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabae oidae) en condiciones de laboratorio.



El orden de efectividad presentado en esta fase fue el siguiente Bb. 14, Bb. cosmo, Ma. 4 y Ma. 1, existiendo en general para la fase de laboratorio una relación directa entre las concentraciones aplicadas y la mortalidad obtenida. Esto concuerda con lo afirmado por Fuertes y Chamorro⁵⁶ quienes anotan que al comparar los promedios de las concentraciones de esporas del hongo *Metarhizium anisopliae*, se encontró que a mayor concentración de esporas/ml fue más alta la eficacia.

En general el testigo para la fase de laboratorio resultó ser el de más bajo porcentaje de mortalidad con un promedio de 5%. La mortalidad encontrada en este se pudo deber principalmente a la manipulación de las larvas en el momento de la recolección y transporte de campo hasta laboratorio, ya que estas larvas a diferencia de *Ancognatha sp* presentan menos rusticidad y agresividad entre ellas.

3.1.3 Determinación de la CL₅₀ en laboratorio. Los resultados obtenidos presentaron una relación positiva concentración/mortalidad permitiendo establecer las CL₅₀ utilizando el análisis Probit.

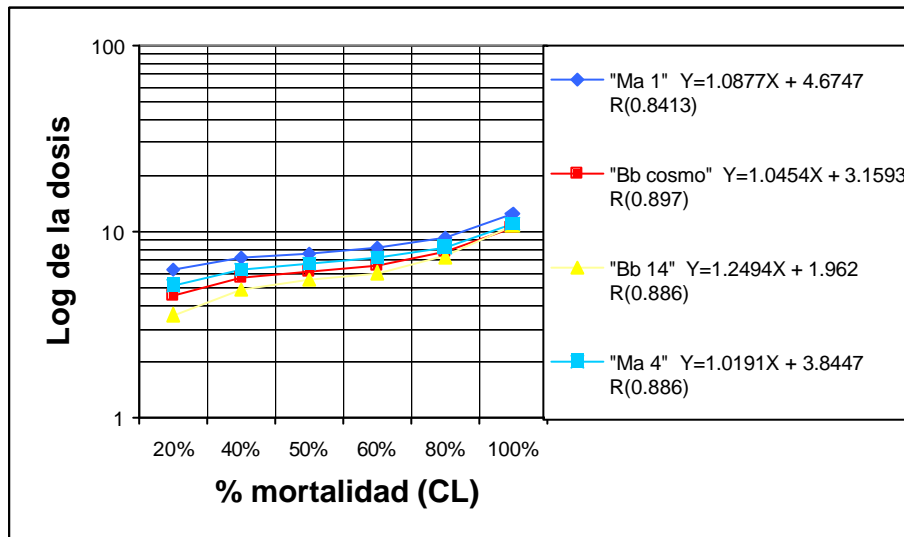
Se determinó este parámetro con el fin de dar bases para futuras investigaciones, los resultados muestran una relación directa entre la efectividad de la mejor cepa y la CL₅₀ más baja. Por lo tanto, la cepa Bb.14 fue la más efectiva a nivel de laboratorio con una mortalidad de 56.56% y una CL₅₀ correspondiente a

⁵⁶ FUERTES, Op cit., p.59.

2.90401×10^5 esporas / ml como la mas baja, y la menor eficacia fue para Ma. 1 con una mortalidad del 41% y la CL_{50} de 7.4264×10^7 esporas / ml, siendo la más alta (anexo F)

Al graficar las líneas de las CL_{50} log concentración sobre porcentaje de mortalidad para todas las cepas evaluadas se observó que todos los datos se ajustaron a una línea de regresión con un nivel de confianza del 87% donde las cepas Bb. 14 y Bb. Cosmo presentaron pendientes más elevadas, lo que hizo que los rangos de las concentraciones medias fueran estrechos, para el caso de Ma. 4 y Ma. 1, las pendientes fueron mas bajas y concentraciones letales medias más altas.

Figura 9. Concentración letal media para 2 cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio



No se debe descartar la posibilidad de hacer pruebas con la cepa Ma. 4 ya que su concentración letal media fue alta, más no existió diferencias en el promedio de mortalidad con las otras dos cepas.

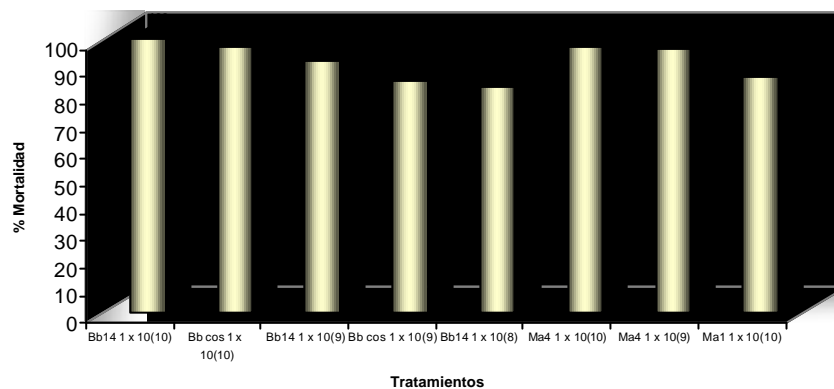
En la figura 9 se ilustra el comportamiento de las cuatro cepas utilizadas en la evaluación mediante una escala logarítmica y un porcentaje de mortalidad progresivo, donde cada punto de la curva representa una concentración letal específica para una mortalidad deseada, para ello es necesario aplicar el antilogaritmo para cada punto en la curva, se observó que todos los datos se ajustaron a una línea de regresión.

El bajo porcentaje de mortalidad obtenido en el testigo demuestra, que en el montaje y el proceso de evaluación del ensayo el error experimental es bajo aportando confiabilidad en este trabajo.

3.2 FASE DE INVENADERO

La figura 10 muestra en forma descendente el comportamiento de las concentraciones seleccionadas las cuales presentaron una mortalidad superior al 80%

Figura 10. Tratamientos seleccionados para la fase de invernadero (mortalidad > 80%), para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea)

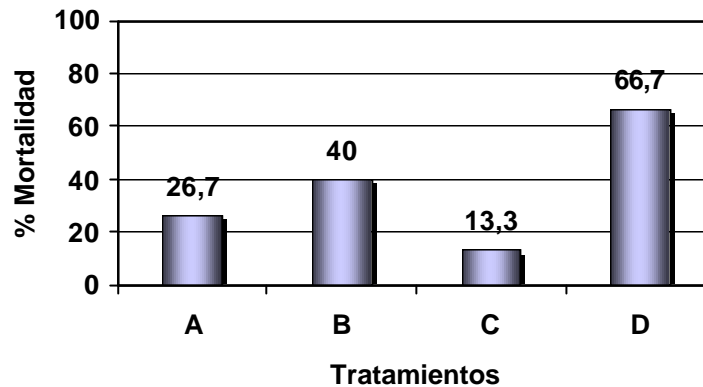


3.2.1 Ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* en invernadero. La figura 11 muestra los resultados obtenidos en el ensayo preliminar para la selección de un sustrato adecuado, en el cual se depositaron las larvas, y se escogió el tratamiento que menor porcentaje de mortalidad presentó, determinándose que el mejor sustrato para garantizar la supervivencia de larvas en las unidades experimentales, fue suelo, materia orgánica con trigo sembrado, el cual presentó una mortalidad de 13.3% seguido de los tratamientos de suelo con 26.7%, suelo más materia orgánica con 40% de mortalidad y suelo más trigo sembrado con una mortalidad del 66.7%.

Esto se debe a que este tipo de sustrato suministran en gran medida las condiciones óptimas que naturalmente encontrarían las larvas en su hábitat. Lo que se puede explicar con lo citado por Peña, L. y Mafla, A. “donde la chisa es uno de los insectos plagas de mayor importancia económica, especialmente en suelos que han sufrido un proceso de degradación por la pérdida de materia orgánica”⁵⁷.

⁵⁷ PEÑA, Op cit., p.3.

Figura 11. . Ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* en la fase de invernadero.



A: suelo

B: suelo más materia orgánica

C: suelo más trigo sembrado

D: suelo más materia orgánica más trigo sembrado

3.1.5 Pruebas de patogenicidad en invernadero. El análisis de varianza (anexo I), muestra diferencias altamente significativas entre tratamientos

Con base en el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan, se encontró que los tratamientos Bb. 14 aplicado en concentraciones de 2×10^{10} esporas /ml y Bb. Cosmo 2×10^{10} esporas/ml, presentaron los porcentajes de mortalidad más altos con 40.0 y 35.23% respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre sí, pero se encontró diferencias significativas con los tratamientos Bb. 14 en concentraciones de 2×10^9 esporas /ml, Bb. Cosmo en concentración de 2×10^9 esporas /ml, Ma 4 en concentración de 2×10^{10} esporas /ml y Ma 1 en concentración de 1×10^{10} esporas/ml, el cual presentó el menor porcentaje de mortalidad con 6.15% (anexo J).

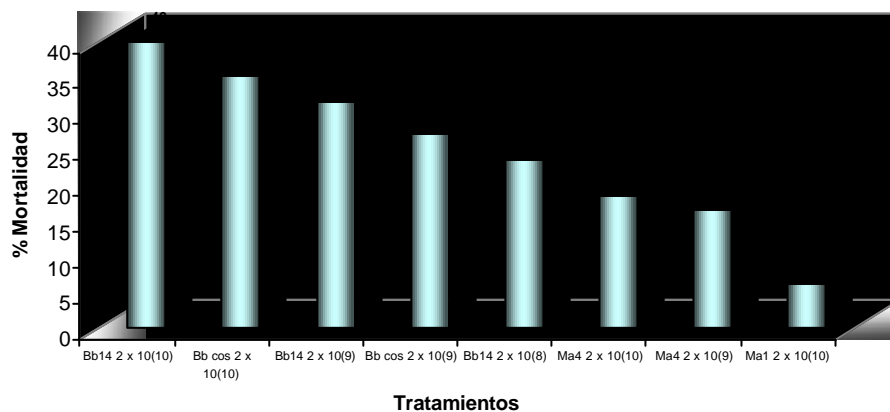
Los tratamientos Bb. 14 en concentraciones 2×10^{10} esporas /ml y Bb. Cosmo 2×10^{10} esporas /ml causaron los mayores porcentajes de mortalidad. Es posible que estos tratamientos hayan logrado una mejor adaptación a las condiciones climáticas del invernadero, lo cual se reflejó en un mejor crecimiento y desarrollo permitiendo una mayor actividad patogénica en los tratamientos. (Figura 12)

La aplicación de altas concentraciones, la especificidad que presenta *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Astaena sp* y el aislamiento de la cepa Bb. 14 de un

insecto de la misma especie, también fueron factores que influyeron en la eficacia de estos tratamientos, lo que no ocurrió con los otros tratamientos. Según Montealegre, citado por Alomía y Cárdenas, “la capacidad infectiva de un patógeno sobre un huésped depende de la raza o cepa utilizada. La cepa nativa es importante para determinar la especificidad de los agentes microbiales, por tanto una raza entomopatógena aislada de cierta especie de insecto será más efectiva al aplicarla a insectos de la mismas características morfológicas y fisiológicas”⁵⁸.

Es importante destacar que los porcentajes de mortalidad obtenidos en laboratorio son realmente altos con respecto a los obtenidos en invernadero. Esto puede ser a que las condiciones en laboratorio de humedad, temperatura, y una fuente constante de alimento, proporcionan a las larvas condiciones óptimas para su supervivencia, y para los hongos un medio adecuado para su germinación. Mientras que en invernadero estas condiciones son menos controladas. Esto se ajusta a lo encontrado por Jojoa, la cual afirma que “bajo condiciones de laboratorio el picudo del algodón *Anthonomus grandis*, es altamente susceptible a la infección por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, lográndose infecciones del 82.22%, de igual forma no se obtuvo al nivel de campo acción efectiva de los entomopatógenos sobre el insecto a excepción de *Beauveria bassiana* que logró infectar un 8.94% y 3.62% después de 20 aspersiones”⁵⁹.

Figura 12. Porcentaje de mortalidad obtenidos en la evaluación de 8 tratamientos de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera. Scarabaeoidea) en condiciones de invernadero.

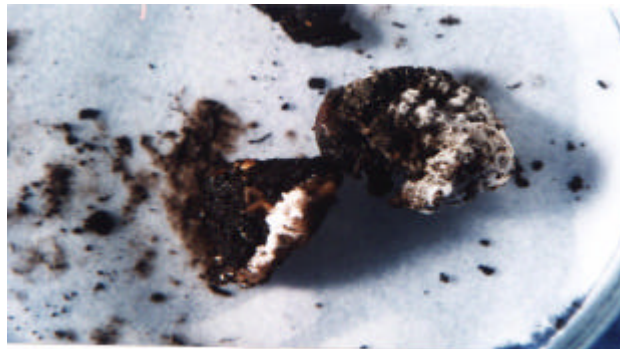


⁵⁸ ALOMIA, Op cit., p.45.

⁵⁹ JOJOA, Gloria. Evaluación de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Y *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin para el control de *Anthonomus grandis* (Boherman) en el Valle del Cauca. Pasto, 1995, 74 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas.p.63.

Igualmente estudios realizados por Narváez⁶⁰, indican que bajo condiciones de laboratorio las cepas de *Beauveria bassiana* permitieron los más altos porcentajes de mortalidad sobre larvas de *Sagalassa valida* w, mientras que los menores fueron para las cepas de *Metarhizium. anisopliae*, situación inversa a la encontrada bajo condiciones de campo.

Figura 13. Larvas de *Astaena sp* afectadas por la cepa *Beauveria bassiana* 14, en prueba de patogenicidad en condiciones de invernadero



La efectividad del hongo en invernadero se pudo ver afectada por condiciones adversas, presentes en el sustrato utilizado en los materos como es la competencia de otros microorganismos, pH y efectos antagónicos que estos pueden causar. De acuerdo con Sosa y Mansur, citados por Narváez, (1993), el suelo ejerce un efecto desfavorable sobre los hongos entomopatógenos, ocasionando un bajo nivel de germinación debido a los compuestos fungistáticos producidos por los actinomiceto y bacterias, que viven saprofiticamente en el suelo.

⁶⁰ NARVAEZ, Ernesto. Evaluación de *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Y *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin sobre larvas de *Sagalassa valida walker* (lepidóptero: Glyphipterigidae) en Tumaco. Pasto, 1993, 70 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. p.60.

4. CONCLUSIONES

Todas las cepas presentaron actividad patogénica contra larvas de *Astaena sp* bajo condiciones de laboratorio destacándose las concentraciones 1×10^9 esporas /ml y 1×10^{10} esporas /ml, en condiciones de laboratorio.

A pesar de que todas las cepas estudiadas fueron patogénicas para larvas de *Astaena sp* se han encontrado diferencias entre la mortalidad causada por los diferentes tratamientos.

Bajo las mismas condiciones de laboratorio e invernadero existió mayor actividad patogénica de *Beauveria bassiana* que de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Astaena sp*

Para todas las concentraciones empleadas, se encontró que las más altas obtuvieron mayores porcentajes de mortalidad, además de presentar una relación directamente proporcional entre el incremento de esporas y la mortalidad larval.

Al establecer la CL_{50} bajo condiciones de laboratorio, se presentó una relación inversa entre la cantidad de esporas determinada por este parámetro y la efectividad de la cepa, donde Bb. 14 presentó el mejor porcentaje de control y la CL_{50} más baja.

Bajo condiciones de invernadero se presenta mortalidad significativa para cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de larvas de *Astaena sp*. aunque la baja eficacia de las cepas en el control, pudo verse afectada por factores de tipo bióticos y abióticos en el establecimiento del ensayo.

Para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* bajo condiciones de invernadero se encontró que el mejor sustrato fue la combinación de suelo, materia orgánica y trigo sembrado.

5. RECOMENDACIONES

Evaluar la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Astaena sp* mediante la utilización de aislamientos obtenidos del mismo insecto bajo condiciones de invernadero y campo. Buscando una mayor especificidad mediante la implementación de cepas nativas, determinando para cada una la concentración letal media (Cl₅₀).

Se recomienda realizar un análisis económico del control y manejo de las chisas con la utilización de hongos entomopatógenos en condiciones de campo.

Para futuros estudios en invernadero se sugiere tener un mayor cuidado en la manipulación de los insectos y el control de la temperatura, las cuales pueden ejercer condiciones adversas para la efectividad de las cepas.

Se recomienda evaluar los mejores tratamientos obtenidos en este ensayo bajo condiciones de campo mediante la utilización de diferentes sustratos para su incorporación

Integrar la utilización de hongos entomopatógenos con las diferentes prácticas de control planteadas por el MIP.

Evaluar diferentes tipos de inoculación y número de aplicaciones de estos hongos bajo condiciones de invernadero y campo.

BIBLIOGRAFIA

ALOMIA, Eduardo. y CARDENAS, William. Evaluación de tres hongos entomopatogenos y dos insecticidas en el control de chisas (*Ancognatha Scarabaeidae B.* y *Astaena sp*) en Nariño. Pasto, 1990, 138 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

ALVEZ, S. Epizootrologio de controle microbiano de insectos. Sao Paulo : manole.1986. 500 p.

ARTEAGA, R y PEÑA, L. "Evaluación del control de gusano blanco mediante la utilización del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana*." En : Informe preliminar N°1 PRONATTA (datos sin publicar), Pasto. 1996

BOLAÑOS, F. *Bacillus popilliae* como organismo entomopatogeno. IICA. Ecuador. Citado de: Biological control a guide to natural enemies in North American (Universi de Cornell) www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/b-popilliae.html. google.com

BORROR, Donal. An introduction to the study of insects. Nueva york : Mc Graw Hill, 1971. 600 p.

CASANOVA, W. Aspectos biológicos de las chisa *Ancognatha Scarabaeoidae*. Pasto, 1991, 80 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

CASTAÑO, C. Él diagnostico de las enfermedades de los insectos fitófilo. México : s.n, 1968. 600 p.

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DEL CAFÉ. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatogenos. Bogotá : CENICAFE. 1995. 20p.

CORPOICA. Manejo integrado de chisas en el departamento de Nariño. En : Boletín divulgativo N° 19, San Juan de Pasto, 2003. 16p.

------. Investigación para el manejo integrado de chisas en fincas de minifundio en los municipios de Yacuanquer y Ospina del departamento de Nariño. En : Boletín técnico N. 3, San Juan de Pasto, 2003. 22 p.

DEBACH, Paul. Control biológico de las plagas y las malas hierbas. México : Continental, 1979. 945p.

ENTREVISTA con Tito Bacca, Docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Pasto. 10 de febrero de 2001.

ENTREVISTA con Luis Peña, Investigador CORPOICA. Pasto. 15 de marzo de 2001.

FUERTES, Edgar y CHAMORRO, Jose. Control microbiano de las chisa *Ancognatha scarabaeoide* con el hongo entomopatogeno *Metharizium anisopliae*. Pasto, 1994, 80 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

JOJOA, Gloria. Evaluación de los hongos entomopatogenos *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Y *Metharizium anisopliae* (Metch) Sorokin para el control de *Anthonomus grandis* (Boherman) en el Valle del Cauca. Pasto, 1995, 74 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas.

KUNO, Goro; MULETT, José y HERNÁNDEZ, Martha. Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. Cali, 1982, 212 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad del valle, Dpto de biología.

MENA, Jacqueline. Patogenicidad y variación de efectividad de *Beauveria bassiana* (bals) Vull y *Metharizium anisopliae* (Metch) en diferentes condiciones ambientales, en poblaciones naturales de *Premnotripex vorax* (Hustache). Cali, 1999, 200 p. Trabajo de grado (maestría en biología). Universidad del valle. Facultad de ciencias.

NARVAEZ, Ernesto. Evaluación de *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Y *Metharizium anisopliae* (Metch) Sorokin sobre larvas de *Sagalassa valida walker* (lepidóptero: Glyphipterigidae) en Tumaco. Pasto, 1993, 70 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas.

PAZOS, Ines y CHECA, Eduardo. Reconocimiento e identificación de hongos entomopatogenos en chisas *Ancognatha sp.* y *Astaena sp.* (Coleoptero: Scarabaeidae) en la zona cerealera del departamento de Nariño. Pasto, 1990, 85 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas.

RODRÍGUEZ, Dora. Control microbiológico del gusano blanco de la papa *Premnotripex vorax* (Coleoptero: Curculionidae). EN: XII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Resúmenes. Medellín, SOCOLEN. 1975. 58p.

RUIZ, Nhora. Y PUMALPA, Norberto. Conozca las chisas y su control. En : Boletín Informativo. Instituto Agropecuario. Colombia. 1987. 3 p.

SAÑUDO, Benjamín; CASTILLO, Guillermo; RAMÍREZ, B. Principios de control biológico de fitopatógenos. Universidad de Nariño. 1994

SAÑUDO, Benjamín et al. Fundamentos de micología Agrícola. Universidad de Nariño. Pasto - Colombia. 2001. 200p.

SAÑUDO, Benjamín; CASTILLO, Guillermo. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. San Juan de Pasto, 1994. 67p.

SALAZAR, Juan y SALAZAR, James. Efecto patogénico de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (bals) Vull. Sobre larvas de *Astaena sp* bajo condiciones controladas. Pasto, 1997, 92 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

STEINHAUS, eduard. Insect microbiology. Nueva York : Mc Graw-Hill, 1977. 763p.

YÉPEZ, B. y NÚÑEZ, E. Aspectos biológicos y control de chisas. Pasto. En : Informe anual. Instituto Colombiano Agropecuario, centro de investigaciones "Obonuco". 1989 p 125 – 135

ANEXOS

Anexo A. Mortalidad obtenida con cuatro cepas de *Beauveria bassiana* y una de *Metarhizium anisopliae* en chisas *Astaena sp*

CEPAS	CONCENTRACIONES	INDIVIDUOS EVALUADOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD CORREGIDA EN %
Bb. 13	1 x 10 ⁷	20	45
	1 x 10 ⁸	20	50
Bb. 14	1 x 10 ⁷	20	75
	1 x 10 ⁸	20	80
Bb. 15	1 x 10 ⁷	20	55
	1 x 10 ⁸	20	60
Bb. 17	1 x 10 ⁷	20	45
	1 x 10 ⁸	20	35
Ma. 4	1 x 10 ⁷	20	70
	1 x 10 ⁸	20	75

Anexo B. Análisis de varianza para la evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, empleadas en el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.

F.V	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.C	Pr > F
Cepa	3	3350.68	1115.89	21.91**	0.0001
Concentración	5	49624.09	8270.68	162.92**	0.0001
Cep * Conc	15	1726.52	35.91	1.88**	0.0372
Error	46	2855.08	50.98		
Total	71	57556.39			
C.V (%)			14.31		

** Diferencias altamente significativas al 95%

Anexo C. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de 2 cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.

CEPA	Porcentaje de mortalidad \pm E.S
B. bassiana 14	56.56 \pm 6.64 A
B. bassiana cosmo	53.80 \pm 7.46 AB
M. anisopliae 4	51.55 \pm 7.22 B
M. anisopliae 1	41.00 \pm 7.18 C

E.S (Error estándar)

* valores con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si (Duncan P<0.05)

Anexo D. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación de 6 concentraciones dos cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.

CONCENTRACIONES	Porcentaje de mortalidad \pm E.S
1×10^{10}	95.26 A
1×10^9	85.31 \pm 13.10 B
1×10^8	70.92 \pm 3.42 C
1×10^7	57.20 \pm 5.36 D
1×10^6	46.79 \pm 5.89 E
1×10^5	22.13 \pm 3.52 F

E.S (Error estándar)

* valores con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si (Duncan $P < 0.05$)

Anexo E. Porcentajes de mortalidad de la interacción de seis concentraciones de dos cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio.

Concentración Espora / ml	cepas			
	M. anisopliae 1	M. anisopliae 4	B. bassiana 14	B. bassiana cosmo
	Porcentaje de mortalidad \pm E.S			
1 x 10 ⁵	10.63 \pm 0.50 E	24.91 \pm 0.61 C	38.65 \pm 2.96 E	14.32 \pm 0.43 E
1 x 10 ⁶	18.16 \pm 2.28 E	60.84 \pm 2.64 B	65.52 \pm 0.69 D	42.66 \pm 2.16 D
1 x 10 ⁷	30.95 \pm 3.20 D	63.74 \pm 3.24 B	76.82 \pm 1.58 CD	57.30 \pm 3.20 CD
1 x 10 ⁸	53.71 \pm 1.63 C	75.34 \pm 3.16 B	82.47 \pm 1.16 BC	72.15 \pm 1.02 BC
1 x 10 ⁹	67.99 \pm 0.78 B	96.49 \pm 1.77 A	92.11 \pm 1.71 B	84.66 \pm 2.11 B
1 x 10 ¹⁰	86.48 A	97.24 A	100 A	97.30 A

E.S (Error estándar)

* valores con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si (Duncan P<0.05)

Anexo F. Concentración letal 50 calculados por medio del análisis probit para dos cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (metch) Sorokin, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea) en condiciones de laboratorio. (T° 13°C, HR 78%)

Cepas	CL₅₀ (esporas / ml)
M. anisopliae 1	4.74264 x 10 ⁷
B. bassiana 14	2.90401 x 10 ⁵
B. bassiana cosmo	1.21545 x 10 ⁶
M. anisopliae 4	5.04970 x 10 ⁶

Anexo G. Tratamientos seleccionados para la fase de invernadero (mortalidad > 80%), para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeoidea).

Tratamientos^a	Porcentaje de mortalidad ± E.S
B. bassiana 14 2x10 ¹⁰	100
B. bassiana cosmo 2x10 ¹⁰	97.30
B. bassiana 14 2x10 ⁹	92.11
B. bassiana cosmo 2x10 ⁹	84.66
B. bassiana 14 2x10 ⁸	82.47
M. anisopliae 4 2x10 ¹⁰	97.24
M. anisopliae 4 2x10 ⁹	96.49
M. anisopliae 1 2x10 ¹⁰	86.48

^a Concentraciones en esporas / ml

Anexo H. Resultados obtenidos en el ensayo preliminar de sustratos para el establecimiento de larvas de *Astaena sp* en la fase de invernadero.

Tratamientos	Nº de larvas / rep	Larvas muertas	% mortalidad
A	5	2	26.7
	5	0	
	5	2	
B	5	3	40
	5	1	
	5	2	
C	5	1	13.3
	5	1	
	5	0	
D	5	4	66.7
	5	3	
	5	3	

A Suelo

B Suelo + materia orgánica

C Suelo + trigo sembrado

D Suelo + m.o + trigo sembrado

Anexo I. Análisis de varianza para la evaluación ocho tratamientos, empleadas en el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabae oidae) en condiciones de invernadero.

F.V	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.C	Pr > F
Tratamientos	7	1335.27	190.75	137.21**	0.0001
Error	16	22.24	1.39		
Total	23	1317.51			
C.V (%)			14.03		

** Diferencias altamente significativas al 95%

Anexo J. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la evaluación ocho tratamientos, para el control de *Astaena sp* (Coleoptera: Scarabaeidae) en condiciones de invernadero.

Tratamientos^a	Porcentaje de mortalidad \pm E.S
B. bassiana 14 2×10^{10}	40.00 \pm 1.55 A
B. bassiana cosmo 2×10^{10}	35.23 \pm 0.46 AB
B. bassiana 14 2×10^9	31.48 \pm 0.87 BC
B. bassiana cosmo 2×10^9	27.09 \pm 0.75 CD
B. bassiana 14 2×10^8	23.57 \pm 0.79 D
M. anisopliae 4 2×10^{10}	18.48 \pm 1.21 E
M. anisopliae 4 2×10^9	16.52 \pm 0.53 E
M. anisopliae 1 2×10^{10}	6.15 \pm 0.79 F

^a Concentraciones en esporas / ml

E.S (Error estándar)

* valores con la misma letra no presentan diferencias significativas entre si (Duncan P<0.05)